

1. За отговор	2. За изпълнение	3. За доклад	4. За становище	5. Информация	6. Да се размножи в екз.	7. За архив	
Срок:				РЕЦЕНЗИЯ			
Допълнителни указания:							

МИНИСТЕРСТВО НА ЗДРАВЕОПАЗВАНЕТО
НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО РАДИОБИОЛОГИЯ И
РАДИАЦИОННА ЗАЩИТА
№ 4/15-10-9
15.11.2019г.
СОФИЯ 1606

на дисертационния труд на гл.ас. Любомира Стефанова Попова-Хаджийска на тема "ЦИТОГЕНЕТИЧНИ ЕФЕКТИ ОТ ЙОНИЗИРАЩО ЛЪЧЕНИЕ ПРИ ДИАГНОСТИЧНИ И ТЕРАПЕВТИЧНИ МЕДИЦИНСКИ ПРОЦЕДУРИ" за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ по Радиобиология

Рецензент: проф. Радостина Тенева Георгиева, дмн,

Гл.ас. Попова-Хаджийска завършва Магистратура по „Биология и химия“ в Софийски университет „Св. Климент Охридски“ през 1997. Започва работа в НЦРРЗ през март 2003 в с-ция Радиобиология. Придобива специалност по Радиобиология през 2009. Участва в редица курсове за обучение и повишаване на квалификацията: юни 2013, BUNDESAMT FUR STRAHLENSCHUTZ, Munich, Germany, Интердисциплинарен подход при научните изследвания в областта на йонизиращите лъчения; март 2017, SCK*SEN ACADEMY, Mol, Belgique, Радиационно индуцирани ефекти с акцент върху генетиката, тератологията, когнитивното развитие, както и здравни проблеми свързани с космоса; април 2019, INSTITUT DE RADIOPROTECTION ET DE SURETE NUCLEAIRE, FRANCE, Неопределености в биологичната, физичната и вътрешна дозиметрия след еднократно облъчване с ИЙЛ. Има участие в три проекта: два по двустранно сътрудничество с ОИЯИ, Дубна (2013-2015, 2016-2018) и един финансиран за фундаментални научни изследвания от 2018. Основни области на научен интерес са: цитогенетика и биодозиметрия.

обща характеристика на дисертационния труд

Възможността да се използват ЙЛ в полза на обществото е едно от големите достижения на човечеството през 20 век. Ползите за здравето при рентгеновата диагностика, интервенционалната радиология, нуклеарната медицина и лъчелечение са безспорни. Днес медицинското облъчване съставлява над 98% от надфоновото облъчване и около 20% от общото облъчване на населението. Но за съжаление са установени рискове, включително от малки дози използвани в диагностиката. Най-често срещаните са: *Сърдечно-съдови заболявания след лъчетерапия - остри ефекти върху перикардиума и дългосрочна сърдечна смъртност. Риска е оценен на 7,4%/Gy. *Ефекти при деца - остри странични ефекти (например пневмонии към 42-я ден); късни ефекти след 90-я ден – хронични възпаления; загуба на органични функции; кожни реакции. *СТ изследвания - на 4 милиона СТ се падат 4870 допълнителни случаи на рак. При повече от едно СТ изследване и кумулирани дози до 50 mGy (KM) заболяване от левкемия се проявява до 2г, а при дози до 200 mGy – до 5г за тумори на мозъка. Засега ефекта от облъчването с ниски дози не е категорично изяснен.

На изясняването на тези проблеми е посветен настоящия дисертационен труд, който съдържа 125 страници, и включва 16 фигури и 23 таблици, разпределени в 5 раздела, изводи и приноси. Използвани са 212 литературни източника, всички на латиница. По раздели текстът се разпределя както следва: увод - 2 стр.; литературен

обзор – 32 стр.; цел и задачи - 1 стр.; материал и методи – 12 стр.; резултати и обсъждане – 49 стр.; изводи и приноси – 3 стр. Представения материал напълно отговаря на Чл 42 (1) и (2) от ПРАВИЛНИК ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“ И НА НАУЧНАТА СТЕПЕН „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“ на НЦРРЗ, както и на Приложение 2 уточняващо препоръчителните изисквания към дисертационния труд. Изпълнени са и изискванията за оформяне на автореферата.

литературна осведоменост и теоретична подготовка

На базата на проучения голям по-обем литературен материал са представени научните постижения по темата на дисертационния труд, ясно са формулирани неизяснените проблеми и е очертан научния проблем, върху който е съсредоточено изследването. Литературният обзор е структуриран в 5 подраздела, в които подробно са анализирани генотоксичните ефекти на ЙЛ, канцерогенния процес, измененията в хромозомната структура и тяхната класификация, връзката с клетъчния цикъл. Специално внимание е отделено на ХА индуцирани от ЙЛ, както и възможностите на количествената цитогенетика при изследване ефектите на дозата, мощността и вида на ЙЛ. Доказана е положителна корелация между ХА в лимфоцити от периферна кръв на население и по-късното развитие на злокачествени заболявания.

Подробно са разгледани различните цитогенетични методи на анализ: ХА и цитокинезис блок МН тест в периферни лимфоцити и микронуклеус тест в ексфолиантни клетки.

Анализирани са наличните резултати от проведен цитогенетичен анализ върху ефекти от медицинско облъчване. Обхванати са различни процедури с различен принос в лъчевото натоварване на пациента. Подчертава се, че даже рискът, свързан с диагностичните изследвания с ниско ниво на експозиция, се очаква да бъде по-голям от нула.

Формулировката на нерешените въпроси, показват задълбочено познаване на проблема от страна на авторката, много добра теоретична подготовка и способността й на базата на подробния анализ да очертае посоката, в която да се насочат научните дирения в дисертационния труд.

Ясно и точно е формулирана целта на научния труд: „Цитогенетична оценка на ефекта от действието на различни диагностични или терапевтични дози ЙЛ върху клетъчния геном при здрави лица и пациенти, облъчени по медицински показания“. Нейната актуалност потвърдихме в предишния раздел на рецензията. По-важните задачи, които авторката си поставя, обхващат: ¹оценка на генотоксични ефекти от панорамни рентгенографии на зъби в епителни клетки от букална лигавица при здрави лица; ²определяне честотата на ХА и МН в лимфоцити от периферна кръв при пациенти, подложени на контрастни артериографии; ³оценка на ефекта от терапевтични дози ЙЛ при пациенти с диференциран тиреоиден карцином, подложени на радиоiod аблация или терапия, след тотална тиреоидектомия, чрез прилагане на цитокинезис блок МН тест и класически цитогенетичен метод на ХА; ⁴сравнение на честотата на ХА и МН в лимфоцити от периферна кръв при пациенти преди

диагностичното или терапевтичното облъчване със спонтанната честота, анализирана при здрави лица от популацията.

Считам, че задачите са правилно подбрани и гарантират постигането на поставената цел.

методичен подход

Изследвани са 3 групи, подложени на различен вид медицинско облъчване: панорамна дентална рентгенография – 32 лица; контрастни рентгенови изследвания включващи церебрални, ренални или коронарни артериографии – съответно 7, 21 и 23 лица; лъчелечение – 26 лица с диференциран карцином на щитовидната жлеза.

В зависимост от вида на медицинското облъчване са прилагани *различни методи* за оценка на ефекта: МН в букална мукоза при денталната рентгенография; честота на ХА и МН в лимфоцити от периферна кръв при контрастните рентгенови изследвания, както и за оценка на евентуалния генотоксичен риск след терапия с ^{131}I .

Група, включваща 209 здрави лица от различни региони на България, които не са били професионално изложени на действието на ЙЛ и други вредни фактори е изследвана за честота на спонтанно индуцираните ХА и МН в периферни лимфоцити и МН в букална лигавица.

Времето на изследване след диагностичната процедура е съобразено с ритъма на обновяване на клетъчната популация.

Физичната оценка на дозата при *инвазивните кардиологични процедури* се основава на входящата кожна доза. *За оценка на получената доза* от терапията с ^{131}I е приложен метаболитният модел на Смит и Едмондс (1984). *За оценка на връзката доза-ефект* е взета под внимание целотелесната доза, оценена по въведената активност в МВq или средното диагностично поглъщане на ^{131}I в тиреоидното ложе, или в областта на шията.

Методът за култивиране на лимфоцити от хепаринизирана венозна кръв е модификация по Evans, 1984. За анализ на МН в бинуклеарни лимфоцити от периферна кръв е приложен цитокинезис – блок микронуклеус теста на М. Fenech and A. Moorley, 1985. Микронуклеус теста в епителни клетки от лигавица на устната кухина е на Stich и Rosin, описан от Titenko-Holland et al., 1994.

Приложена е подходяща статистическа обработка. Използвана е версия IBM SPSS Statistics 19 за Windows, параметрични, непараметрични (Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уйлк или Ман-Уйтни) в зависимост от наличието или отсъствието на нормално разпределение, вариационен анализ на количествени промени, честотен анализ на качествени променливи и корелационен анализ.

значимост и убедителност на получените резултати

Резултатите са описани изчерпателно и коректно в четири глави, Представени са ясно и нагледно в 16 таблици и 10 фигури/снимки. Приложена е подходяща статистическа оценка. Последващо те са обобщени и обсъдени в светлината на литературните данни, също в четири глави:

**Микронуклеус тест в ексфолиантни клетки от букална лигавица при здрави лица, подложени на панорамна рентгенография на зъби*

Клетките на букалната мукоза са силно пролиферативни и са част от групата на епителните клетки, която е източник на повече от 90% от всички ракови заболявания при човека. МН тестът в ексфолиантни букални клетки е минимално инвазивен, приложим за мониторинг на генетични увреждания, като механизмът на формиране на микроядрата е идентичен с този при периферните лимфоцити.

Отчитани са по 2000 клетки на донор преди и след провеждане на диагностичната процедура, а честотата на МН е оценена по критерии на Tolbert et al., (1992).

Честотата на букални клетки с МН е слабо повишена в сравнение с тази преди диагностичното облъчване. Разликата **няма статистическа достоверност**. Получените данни предполагат, че панорамните рентгенографии не могат да индуцират мутагенни ефекти в клетките на лигавицата на устната кухина, подкрепяйки други подобни проучвания.

Статистическият анализ на резултатите показва, че **възрастта, но не и полът**, има значима връзка с контролна честота на микроядрата за изследваната популация. Значима положителна връзка с възрастта също е получена от други автори.

Докторантката препоръчва, стоматологичните процедури, включващи рентгеново лъчение да се предписват само когато се считат за необходими.

**Цитогенетични ефекти в лимфоцити от периферна кръв на пациенти, подложени на контрастни рентгенови изследвания*

Изследвани са генотоксичните ефекти от комбинираното действие на рентгенови лъчи и рентген-контрастното вещество, включващи **бъбречни, мозъчни и коронарни артериографии**. Доказана е повишена честота на ХА и МН, което е достоверно за ХА при пациенти с проведена бъбречна и коронарна артериография. За пациентите с мозъчна артериография повишението няма статистическа значимост.

**Цитогенетично изследване на пациенти с диференциран тироиден карцином (ДТК), подложени на РАЙ или РАТ след тотална тироидектомия*

При лъчелечение на карцином на щитовидната жлеза се прилага ¹³¹I, радионуклид, който е β/γ емитер с период на полуразпадане 8 дни. Попаднал в човешкия организъм, има свойството да се натрупва в щитовидната жлеза. Границите, в които варира оценената целотелесна доза от радиоiod терапията и радиоiod аблацията са от 216 до 262 mGy. Авторката открива умерена положителна зависимост на получената от пациентите целотелесна доза, върху нарастване честотата на клетките с ХА. Слаба, но достоверна корелация с дозата се наблюдава и за честотата на клетки с микроядра.

Доказана е статистически достоверна разлика в честотата ХА и МН, оценени след лъчелечението, между пациентите за които терапията е втора в рамките на 1 година и тези за които това е първа лъчетерапия. Честотата на ХА и МН един месец след терапията с ^{131}I показва достоверно повишение, с увеличаване на целотелесната доза.

**Сравнение на спонтанно индуцирани ХА и МН с началната честота при пациенти, подложени на медицинско облъчване.*

За оценка на възможните генотоксични ефекти е необходим обстоен обзор върху спонтанно индуцираните хромозомни увреждания. Въпреки стандартизирането на протоколите, съществуват междулабораторни различия, като е препоръчително всяка биодозиметрична лаборатория да разполага със собствени контролни данни. В настоящото изследване честотата на спонтанно индуцираните ХА е анализирана при 140 здрави лица. Не е открита статистически достоверна разлика между мъже и жени, както и зависимост от **възрастта** на изследваните лица.

Що се отнася до прилагането на МН теста, трябва да се отчитат въздействието на **възрастта, пола и начина на живот**. Методът има известни ограничения, тъй като е с голяма вариабилност. Средните стойности за показателя честота на МН/1000 клетки са оценени при 86 мъже и 38 жени, като разликата по **пол** е недостоверна. Статистически достоверно, макар и много слабо повишение с **възрастта** е наблюдавано по отношение броя клетки с 2 и повече микроядра. Няма достоверна разлика между **пушачи** и **непушачи** по този показател, което е в съгласие с натрупаните от международния съвместен проект HUMN данни.

Честотата на ХА на пациенти преди контрастното рентгеново изследване е съизмерима със същите показатели, оценени в здрави лица.

При пациенти с проведена контрастна артериография, **честотата на МН** в преди изследването, показва повишение спрямо определеното спонтанно ниво. При разделяне на пациентите по процедури, достоверна разлика със спонтанното ниво показват пациентите с **проведена сърдечна коронарография**. Подобни резултати са докладвани при изследване на пациенти със заболяване на коронарните артерии, както и достоверна положителна **зависимост между тежестта на заболяването и честотата на МН**. При анализа на докторантката всички пациенти претърпели коронарография са **диагностицирани с исхемична болест** на сърцето. Такава разлика не се доказва при **пациенти с други изследвани контрастни процедури**.

Честотата на анализираниите **ХА при пациенти с ДТК** преди лъчелечението е съизмерима със същите показатели, оценени в здрави лица. Не е установена статистически значима разлика в анализираниите показатели при пациенти и в контролната група. При изследване честотата на **МН** в бинуклеарни лимфоцити на пациенти преди терапията е установено, че тя е близка до анализиранията спонтанна честота при здрави лица от популацията. Открита е **умерена възрастова зависимост** на клетките с МН и общия брой МН преди лъчелечението. Зависимост от възрастта при пациенти с радиоiod аблация е докладвана и от други автори.

Установена е **значителна индивидуална вариабилност** в първоначалната честотата на клетки с МН (от 2% до 30.5%) в групата на пациентите, като и в

контролната честота (от 1‰ до 31‰). **Възрастовата зависимост** на клетките с МН и особено на общия брой МН е значима при пациентите и след лъчетерапията.

**Спонтанно индуцирани МН в епителни клетки*

Намерената **възрастово** обусловената геномна нестабилност в епителната тъкан е обяснена с по-ниския репаративен капацитет в сравнение с периферни лимфоцити. Статистически значима положителна корелация с възрастта е показана и от други автори.

Повечето автори при изследване влиянието на **пол и възраст** разделят групите на пушачи и непушачи, за да избегнат объркващото влияние на фактора тютюнопушене. Докторантката намира **статистически достоверно влияние на възрастта** върху честотата на МН/1000 букални клетки в групата на непушачите. За пушачи това влияние не е статистически достоверно.

Изследването показва, че **МН в букални клетки са подходящ биомаркер за определяне на генотоксичен ефект**, тъй като букалната лигавица е целева тъкан за въздействието на карциногени, постъпили чрез инхалиране или поглъщане. **Тютюнопушенето** е фактор, влияещ върху честотата на МН в букални клетки, която е достоверно по-висока при пушачи, в сравнение с непушачи. При елиминиране на фактора тютюнопушене, честотата на МН в тази клетъчна система е в право пропорционална, статистически достоверна зависимост от **възрастта** на изследваните лица.

Въз основа на всички получени резултати докторантката прави **4 извода**, за всяка от изследваните области на медицинско облъчване: ¹Отсъствие на генотоксичен ефект в епителни клетки от букална лигавица при **панорамна рентгенография** на зъби - няма повишение в честотата на МН след диагностичното облъчване; ²Повишение в честотата на ХА и МН в лимфоцити от периферна кръв на пациенти, след **контрастно рентгеново изследване**, статистически значимо за ХА след бъбречна и коронарна артериография; ³Достоверно повишение в честотата на ХА и МН в лимфоцити от периферна кръв на пациенти с DTC, след **лъчелечение с радиоактивен йод**, корелиращо с целотелесната доза. ⁴Значителна разлика в честотата на микроядра при пациенти преди провеждане на **сърдечна катетеризация**, в сравнение с определеното спонтанно ниво. За всички останали пациенти не се доказва разлика в честотата на изследваните биомаркери, сравнени със спонтанната честота.

характер на научните приноси

Приносите в дисертационния труд на гл. Ас. Любомира Попова-Хаджийска са преимуществено научно – приложни. За първи път е проучено влиянието на йонизиращото лъчение при панорамни рентгенографии на зъби. За първи път е установена повишена честота на цитогенетични биомаркери при сърдечни катетеризации. За първи път е оценен генотоксичен ефект от вътрешно облъчване при радиойод аблация и радиойод терапия.

Въведен е метод за изследване на генотоксичност в нова клетъчна система – букални епителни клетки.

Съгласна съм с научно-приложните и нетодичния принос, посочени от г-жа Попова в изготвената от нея справка (стр. 107).

оценка на качеството на научните трудове по дисертацията

Във връзка с дисертацията са представени 3 отпечатани научни труда, на които г-жа Попова е първи автор, което е доказателство за нейния основен личен принос.

Първият “Micronucleus test in buccal epithelium cells from patients subjected to panoramic tomography” отразява генотоксичния ефект от радиационно облъчване за дентални диагностични цели, измерен чрез образуването на МН. Отпечатан е в специализираното издание Dentomaxillofacial Radiology през 2007г. От 2008 до тази година има 27 цитирания в реномирани издания като: Int J Radiat Biol, Anticancer Research, Mutagenesis, Journal of Clinical and Diagnostic Research, Radiation Medicine, J Cytol, Oral & Maxillofacial Pathology Journal, Journal of Clinical Pediatric Dentistry, Cytology and Genetics и други.

Втората публикация “Cytokinesis-block micronucleus test in patients undergoing radioiodine therapy for differentiated thyroid carcinoma” (2005) е в Hellenic Journal of Nuclear Medicine и отразява резултатите за генотоксичния риск при пациенти с диференциран карцином на щитовидната жлеза, подложени на терапия с радиоiod-131 след тиреоидектомия. Същата е цитирана 11 пъти в: Mutat Res, Radiation and environmental biophysics, World J Nucl Med, APMIS и други.

Третата публикация “Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of patients undergoing coronary angiography” (2016) е издадена в списанието Radiation Protection Journal, орган на българската асоциация по радиобиология и радиационна защита. Докладвани са установите цитогенетични ефекти при пациенти, подложени на коронарна артериография.

Гл. ас. Попова е представила част от дисертационния труд като пленарен доклад “Cytogenetic effects of diagnostic X-ray and contrast media in human peripheral blood lymphocytes” на ECR 2005 с публикувано резюме в European Radiology. Обсъдени са резултатите за пациенти, подложени на церебрална и бъбречна артериография.

доколко изследванията по дисертацията са предимно лично дело на докторанта

Гл. Ас. Попова работи повече от 16 години в секция “ Радиобиология”, в областта на радиационната генетика – основен стълб в радиобиологията и задължителен елемент от здравния мониторинг на професионално облъчвани лица. Това е гаранция, че тя притежава необходимата теоретична подготовка и практически знания за да изпълни поставените в дисертационния труд задачи. Като добавя и моите лични наблюдения, потвърждавам че проведените лабораторни изследвания и анкетните проучвания са лично дело на авторката.

заклучение

Дисертационният труд на гл. ас. Любомира Попова е посветен на актуален световен проблем – радиационната защита при медицинско облъчване. Той представлява задълбочено изследване на генотоксичния риск за 3 вида медицински практики – лъчелечение, контрастни рентгенови изследвания и панорамна рентгенография (засягаща буквално всеки един от нас).

Проведените от дисертантката изследвания и определените на тази основа конкретни промени и зависимости са безпорни достойнства на този научен труд. Научните приноси обогатяват познанията за генетичните увреждания при медицинско облъчване. Те разширяват възможността за оценка на радиационния риск и в тази връзка имат значение и за радиационната защита.

Дисертантката показва отлично владение на съвременните методи в областта на радиационната цитогенетика и задълбочено познаване на проблема върху който работи.

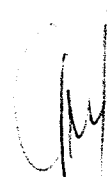
Прави впечатление езика на написване, лекотата с която се чете текста, логичната последователност при развиването на тезите.

Дисертацията има важни научно приложни и методични приноси и отговаря напълно на изискванията на Закона.

Въз основа на всичко гореизложено препоръчвам на уважаемото Научно жури да гласува за присъждане на гл. ас. Любомира Стефанова Попова-Хаджийска научната и образователна степен "доктор"

14.11.2019г

Рецензент:



/Р. Георгиева/