

1. Оценка на актуалността на темата

Дисертационният труд е посветен на важен медицински проблем: хронична миелоидна левкемия (СМЛ), засягаща 1-2 случая на 100,000 възрастни и представляваща 15% от ново диагностицираните случаи с левкемия. Актуалността на тематиката е определена от революционните открития при разработване и прилагане на нови терапевтични подходи и персонализирана терапия, базирана на блокиране на генетичната мишена (BCR-ABL хромозомно преустройство) с тирозин киназни инхибитори (ТКИ). Въпреки поразителния лечебен ефект на ТКИ, определена група пациенти с СМЛ и Филадельфия-позитивни (Ph+) клетки са резистентни на лечение с ТКИ иматиниб. Те представляват сериозен проблем за медицината и са широко проучени за мутации в тирозин киназния домейн на BCR-ABL. Изборът на лечение на СМЛ пациенти се определя от възможностите на генетичните анализи да диагностицират патогенните мутации, създаващи резистентност. Дисертационният труд разглежда актуален проблем от първостепенно значение за пациентите – провеждане на правилна терапия, на правилния пациент според неговата генетична конституция. Изследването е фокусирано върху определяне на чувствителност и ефективност на нов за медицинската практика метод на цифров PCR (Дигитален емулсионен PCR) чрез сравнителен анализ с други подобни PCR техники за анализ на мутации при СМЛ пациенти резистентни на ТКИ.

Актуалността на темата и приноса на проучването е предопределена от съвременното развитие на науката в посока към персонализирана медицина.

Материалът на дисертационния труд е разделен на стандартни части.

Въведение, което представя значимостта на проблема и необходимостта от извършване на ново научно изследване.

Обзорът е написан задълбочено и обхватно, отразява високо ниво на познание на литературните източници. Началото започва логично с дефиниране на използваните съкращения на латиница за улеснение на читателите. Литературната справка представлява аналитичен и центриран преглед върху проблема с последователен поглед върху историческото развитие на познанията за CML, разглеждане на молекулярната патогенеза - формиране на фузионен BCR-AB ген от реципрочна транслокация между хромозоми 9 и 22, t(9;22) при 95% от болните, фузионните транскрипти с различна дължина според точките на прекъсване (e1a2, b2a2, b3a2 и e19a2) и техните химерните протеинови продукти (p190, p210 и p230); други хромозомни пренареждания, като сложни транслокации или инсерции при 5% от пациенти с ХМЛ. Обсъден е хипотезата за клоналният характер на болестта от левкемични стволови клетки (LSC), левкемични родоначални клетки (LP) и трансформирани левкемични бласти (TLB).

Поставен е акцент върху лечебните подходи, разгледани в исторически аспект и развити в ерата на тирозин-киназните инхибитори, които се прилагат след генетична диагностика. Важна част от литературния обзор е акцента върху отговора към терапия с ТКИ според морфологични, цитогенетични и молекулярни параметри, успоредно проследявани във времето. За клиницистите най-тежкият проблем е развитие на лекарствена резистентност, която налага анализ и преценка на терапевтично поведение при конкретния пациент. Дисертантът разглежда обстойно известните механизми на това явление, за което все още няма надежден прогностичен маркер и изнесе на преден план концепцията за резистентност чрез придобиване на мутации.

Работната платформа на дисертационния труд приоритизира възможностите на цифрово-емулсионен PCR (Droplet Digital ddPCR) пред

други генетични методи за молекулярна диагностика и за подобряване на съвременното клинично управление на ХМЛ.

2. Оценка на целта, задачите и методологията

Целта на дисертационния труд е добре и ясно формулирана – проучване чувствителността и ефективността на нови PCR методи за откриване на мутации в ТКД при пациенти с (Ph+), резистентни на ТКИ и за мониториране на терапевтичния отговор при тези пациенти.

Задачите са изведени логически от целта и са насочени към нейното реализиране. Те включват:

- Провеждане на внимателната селекция на пациенти с клинична диагноза CML, резистентни на ТКИ от първо и второ поколение и изолиране на ДНК;

- Оптимизиране и внедряване на адекватни методични подходи за идентифициране на мутацията T315I на базата на цифров емулсионен PCR и RT-qPCR TaqMan™ Mutation Detection Assays;

- Анализ на степента на чувствителността на три PCR метода (RT-qPCR qBiomarker Somatic Mutation; RT-qPCR TaqMan™ Mutation Detection Assays и Цифрово-емулсионен PCR) за детекция на мутации в киназния домен на ABL1;

- Оценка на ефективността на цифрово-емулсионен PCR за мониторинг на терапевтичния отговор.

Важно значение за планиране на изследванията има точно дефинирани включващи критерии за участие в проучването на пациенти според международните и национални препоръки за мониториране на ефекта от лечение с ТКИ (иматиниб или нилотиниб или дазатиниб) при болни с ХМЛ, Ph+. Изследваната клинична група включват достатъчен

брой индивиди (90 лица), което гарантира получаване на достоверни резултати.

Използвани са три високо чувствителни PCR метода базирани на: qBiomarker Somatic Mutation PCR тестове в реално време (QIAGEN) за наличието на 6 клинично значими мутации (с.757T>C, с.763G>A, с.764A>T, с.1075T>G, с.951C>G, с.944C>T); TaqMan™ Mutation Detection Assays (TaqMan™ мутационен анализ) и цифрово емулсионен PCR (ddPCR) за идентифициране на мутация T315I в място 944C>T в ABL1 гена.

Тези изследвания не са самоцелни. Една от основните задачи на докторанта е да се оцени ефективността и приложимостта на ddPCR за мониторинг на терапевтичния отговор.

Използваните клинични критерии и молекулярно-генетични методи са адекватни на поставените задачи. Те са подробно описани и доказват, че изследването е изцяло дело на докторанта.

Получените резултати са убедителни и демонстрирани с високо качествени снимкови материали. Резултатите са подложени на адекватна статистическа обработка със специфични софтуерни програми.

3. Оценка на резултатите

Получени са интересни резултати от молекулярно генетичните изследвания на пациенти със CML, отговарящи на критериите за включване в проучването.

От проведените анализи на 90-те пациента положителен резултат за мутация T315I е установена с qBiomarker Somatic Mutation PCR тестове в реално време (QIAGEN) при 4 пациенти, а при един 2 свързани мутация - T315I и E255K изследвани; с RT-qPCR TaqMan™ Mutation Detection Assays мутацията е идентифицирана при същите 5 пациента; с ddPCR наличие на T315I е потвърдено при 5-те пациента с брой на мутантните копия на

микролитър \leq от половината от броя на дивия тип алел; (средно 41.5-45.1 спрямо 91-103 на див тип) и допълнително при още 5 пациента, но с пониско ниво.

Сравнителният анализ на данните за мутация T315I при селектирани пациенти с ХМЛ, безспорно номинира ddPCR пред другите методи (RT-qPCR qBiomarker Somatic Mutation и RT-qPCR TaqMan™ Mutation Detection Assays). Резултатът от анализа доказва, че ddPCR е единствения метод, с който е възможно да се определи честотата на мутантния алел спрямо дивия.

Интересни са резултатите от мониторинга на мутация T315I, изследвана за период от 2 години (през 8 месеца) при 11 пациента със загуба на терапевтичен отговор към терапия с ТКИ от първо и второ поколение с трите тествани PCR метода. Данните показват, че само с ddPCR мутация е диагностицирана с нисък брой копия (средно 0.13%)

4. Оценка на обсъждането

Обсъждането е направено адекватно на получените резултати, които са разгледани в контекста на данни от предишни изследвания. Текстът е структуриран логически правилно и разкрива задълбочено познаване на материята.

С qBiomarker Somatic Mutation PCR тест е доказана мутация T315I при 5 пациента (5.5%). Изследването е предназначено за идентифициране на E255K/V , Y253H, или F359V/C/I мутации, които се препоръчват за прецизиране на лечението при 2-ра генерация ТКИ. Интересен е получения резултат за носителство на две мутации при един пациент, едната е T315I, с които е обяснена неефикасността на първа и на втора генерация ТКИ.

TaqMan™ Mutation Detection Assays (TaqMan™ мутационен анализ) + castPCR е определен силно специфичен и чувствителен метод метода в сравнение с qBiomarker Somatic Mutation PCR, тъй като може да открие

Заклучение

Като имам предвид актуалността на проблема, използваните съвременни методични подходи, получените резултати с важен научен и практически приложен принос за използване на ddPCR технология за идентифициране и мониторинг на ниски алелни състояния на таргетната мутация, определям дисертационният труд като успешно разработен, отговарящ на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ).

Във връзка с гореизложеното, оценявам високо резултатите на докторанта и си позволявам да препоръчам убедено на уважаемото Научно жури да присъди на АЛЕКСАНДЪР ЙОРДАНОВ ЛИНЕВ образователна и научна степен “ДОКТОР” в област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”, професионално направление: „Биологически науки”, Шифър 4.3, Научна специалност: „Генетика”.

25.07.2021 г.

София

Рецензент: 

Чл. кор. Проф. д-р Драга Тончева-Митева,

Катедра по медицинска генетика, Медицински Университет -София