

СТАНОВИЩЕ

от

проф. д-р Савина Петрова Хаджидекова, дм,  
Ръководител на Катедра по Медицинска генетика, МФ, МУ-София,

на

дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'

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

по акредитирана докторска програма: „Генетика“

професионално направление: 4.3. Биологически науки

**Автор:** Александър Йорданов Линев

**Форма на докторантурата:** редовна

**Катедра:** Педиатрия и медицинска генетика, МУ-Пловдив

**Тема:** „Молекулярно-генетични подходи за прогноза и мониторинг на пациенти с хронична миелоидна левкемия“

**Научен ръководител:** Проф. д-р Вили К. Стоянова, дм, Катедра „Педиатрия и медицинска генетика“, МУ-Пловдив

### 1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Становището е изготвена съгласно Заповед Р-1089/05.07.2021 на зам. Ректора по НИД при Медицински Университет – Пловдив.

Представеният комплект материали е в съответствие с чл.70 (1) от I.Раздел. Придобиване на образователна и науча степен „ДОКТОР“ и научна степен „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“ в МУ-Пловдив; Правилник на МУ-Пловдив от 28.01.2021 г. и включва следните документи:

- Заявление до Ректора на МУ-Пловдив за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд
- автобиография в европейски формат с подпис на докторанта
- нотариално заверено копие от диплома за висше образование
- заповеди за записване в докторантура
- заповед за провеждане на изпит от индивидуалния план и съответен протокол за издържан изпит или докторантски минимум по специалността
- протокол от катедрен съвет за предварително обсъждане на дисертационния труд и взетите решения за разкриване на процедура и за състав на научно жури
- дисертационен труд
- автореферат
- списък на научните публикации по темата на дисертацията
- копия на научните публикации

- списък на участията в научни форуми
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи

Докторантът е приложил 5 публикации, от които 2 са от участия в научни конференции.

Предоставените материали по защитата съответстват на законовите и процедурните изисквания.

Докторантът Александър Йорданов Линева е роден през 1977 г. През 2002 г. се дипломира като “Бакалавър” по специалността Биология в ПУ “Паисий Хилендарски“, а през 2004 г. – като магистър по „Микробни и растителни биотехнологии“ при същия университет.

От 2004 г. до момента работи като биолог-микробиолог в От 10.10.2004 до момента в Отделение по медицинска генетика, УМБАЛ “Свети Георги”. Сред професионалните умения и отговорности в рутинната диагностична и научна дейност на докторанта влиза широк набор от техники за генетични анализи - цитогенетични, молекулярна-цитогенетични и молекулярно-генетични анализи.

## **2. Актуалност на тематиката**

Трудът на докторанта е посветен на малигнено заболяване на хемопоезата – хроничната миелоидна левкемия (ХМЛ) и нейния отличителен белег - Филадельфийската (Ph) хромозома. Дисертантът разглежда и описва детайлно биологичното и клиничното значение на точковите мутации в *BCR-ABL* гена, които намаляват или инхибират свързването с иматиниб. Нагледно представен е цифровия PCR метод за абсолютно молекулно количествено определяне с потенциал за надграждане на RT-qPCR. Предизвикателство пред дисертанта е използването на тази технология както при мониторинг на минимална резидуална болест (MRD) при пациенти в дълбока молекулярна ремисия и такива с прекратена терапия, така и при ранен мониторинг на мутациите при лош отговор на терапията с ТКИ. В търсене на отговор на въпроса подходящ ли е методът за прилагане в клиничната практика при пациенти с ХМЛ е извършен сравнителен анализ на чувствителността и ефективността на цифровия PCR с други подобни техники.

Изследването на мутациите в *BCR-ABL* на ТКД (тирозин киназния домейн) представляват изискване към днешния ден поради резистентността към различни ТКИ терапии и относно избора на лечение на пациенти с ХМЛ. В представения от кандидата дисертационен труд са приложени различни PCR методи, в търсене на метода с най-голяма чувствителност за откриване на мутации в *BCR-ABL* ТКД. Чувствителността на детекция на мутациите е най-висока чрез QX200 Droplet Digital PCR System - BioRad (Дигитален емулсионен PCR), значително превъзхождаща други PCR техники.



### 3. Познаване на проблема

Структурата, съдържанието и обема на литературния обзор показват отлично познаване на проблема и отразяват изчерпателно проучванията на литературните данни, с логична постройка. Стилът е достъпен, на литературен български език. В началото на обзора е направена историческа справка на заболяването - хронична миелоидна левкемия (ХМЛ). Дискутирана е молекулярната патогенеза, *BCR-ABL* в здрави индивиди и клетъчната пролиферация. Последователно са разгледани актуалните и историческите аспекти при лечението на хроничната миелоидна левкемия, съвременната диагностика и стадиране, видовете терапия и конкретно терапията с ТКИ. Дискутирана е ефикасността на препарати от първа генерация - STI-571 (иматиниб, Gleevec / Glivec) и втора генерация - Дазатиниб (BMS-354825, Sprycel, Bristol-Myers Squibb), Нилотиниб (MN107, Tasisa, Novartis Pharmaceutical Corporation, NJ), Босутиниб (SKI-606) – двойни Src-ABL1 киназни инхибитори, както и трето поколение ТКИ - понатиниб, предходно наричан AP24534, като единствен представител с доказана клинична активност срещу резистентната мутация към 1-во и 2-ро поколение инхибитори T315I. Проследен и описан е различния тип отговор на ТКИ терапията, базиран на успоредно проследяване във времето морфологични, цитогенетични и молекулярни параметри. Описани са и най-масово приетите експертни критерии на ELN в Европа, СЗО и Националната всеобхватна мрежа за борба с рака (NCCN), по-често използвани в САЩ. В литературния обзор е засегната и първичната и придобитата резистентност към ТКИ терапията, както и резистентността към Иматиниб на базата на откритата на мутация в *BCR-ABL* TKD тирозин киназната област и резистентността към втора генерация ТКИ. Описани са водещи проучвания изучаващи произхода на мутациите чрез мутационен анализ в различни етапи на заболяването, при диагностициране, при устойчив ССуR, при загуба на първичен отговор (вторична или придобита резистентност към иматиниб), преди преминаване към ТКИ от второ поколение, при втора резистентност към ТКИ и при авансиране на заболяването. Видовете мутационен анализ са нагледно описани в обзора, Първият високо чувствителен RT-qPCR базиран метод се постига чрез комбиниране на алелно-специфично амплифициране и откриване на сондата чрез хидролиза и въз основа на него са разработени и намират приложение в практиката qBiomarker Somatic Mutation PCR тестове в реално време (QIAGEN). Вторият високо чувствителен RT-qPCR базиран метод е базиран на TaqMan™ мутационен анализ. Цифрово-емулсионният PCR (ddPCR) позволява абсолютно количествено определяне на нуклеиновите киселини и този метод е акцентът на дисертационния труд - проучване на чувствителността и ефективността на ddPCR за детекция на *ABL1* мутации в ТКД при пациенти с хронична миелоидна левкемия, както и проучването на неговото приложение в клиничната практика при мониториране на терапевтичния отговор при пациенти с ХМЛ.

Обзорът показва, че докторанта е добре запознат с материята и методите с които работи. Давам висока оценка на литературния обзор не само заради отличното познаване и анализирани на литературните данни, но и затова, че той е систематизиран и насочен към конкретните задачи на дисертацията.

#### **4. Методика на изследването**

##### **Методи**

При изпълнението на горепосочената цел за използвани следните методи на изследване:

1. Изолиране на тотална ДНК от кръвните образци чрез използването на QIAamp DNA Blood Mini Kit (250) QIAGEN
2. Количествен анализ на изолираните образци от тотална ДНК
3. Високо чувствителни PCR базирани методи за детекция на ABL1 мутации, при пациенти с хронична миелоидна левкемия (CML)
4. Цифрово емулсионен PCR (ddPCR).

От прегледа на експерименталните техники, може да се заключи, че в процеса на обучението си притежава качества на квалифициран генетик. Усвоени и приложени са широк кръг от класически и съвременни молекулярно биологични методи. Очевидно е, че докторантът има достатъчно молекулярно-биологични познания и използваните методи са подробно описани и обяснени. Приложените методи съответстват на поставените цели и задачи.

##### **Материали**

Материалът за дисертационния труд е събран в „Клиника по клинична хематология“, 1-ва катедра „Вътрешни болести“, МУ-Пловдив. Контингентът на изследването включва 90 пациента с доказана ХМЛ за период от 3 години лекувани и проследявани в горепосочените звена. Подборът на изследваните пациенти се базира върху критериите за терапевтичен отговор и времето за неговото постигане, като изборът на мутациите се основава на литературни данни. Изследваните пациенти са лекувани с иматиниб (де-ново диагностицирани пациенти с ХМЛ в хронична фаза) или нилотиниб или дазатиниб при наличие на резистентност към иматиниб. Средната възраст на пациентите е 46,6.

#### **5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите**

Дисертационният труд е съобразен с обичайното структуриране на работа от този тип, съгласно възприетите у нас стандарти на дисертация за получаване на научната степен „доктор“. Той включва върху 94 страници, в това число: Въведение – 2 стр., Литературен обзор – 30 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материал и методи – 10 стр., Резултати – 13 стр. и Дискусия – 6



стр., Изводи и Приноси - 2 стр., Цитирана литература - 8 стр. Трудът е онагледен с 19 фигури и 5 таблици в текста. Цитирани са 232 литературни източници, всички на латиница.

Дисертационният труд показва добро оформление и онагледяване, което заслужава висока оценка.

Анализът на резултатите от собствените проучвания базирани на високо чувствителни PCR методи за детекция на *ABL1* мутации при пациенти с хронична миелоидна левкемия (ХМЛ) е представен в 5 подраздела:

- 1) Високо чувствителен (качествен) PCR метод на разработените qBiomarker Somatic Mutation PCR тестове в реално време (QIAGEN).
- 2) RT-qPCR TaqMan™ Mutation Detection Assays
- 3) Цифрово емулсионен PCR (ddPCR)
- 4) Сравнителен анализ на чувствителността на трите PCR базирани методи за откриване на мутация T315I във фузионния ген *BCR-ABL*.
- 5) Мониторинг на мутация T315I

Настоящата работа разглежда мутации в домейна на *BCR-ABL* тирозин киназата, водещи до различна степен на резистентност към ТКИ. Стремехът на дисертанта и екипа му да определи метода с най-голяма чувствителност при откриване на мутации в *ABL 1* гена, да оцени бързината на изпълнение и икономическата ефективност чрез прилагане на различни PCR модификации. Идентифицирането на мутации в домейна на *BCR-ABL* тирозин киназата е определящо за лечение на пациенти с ХМЛ. Изборът на най-подходящата прицелна терапия се улеснява при наличието на алгоритъм/протокол за ранна детекция на прилежащите мутации. В настоящия дисертационен труд са използвани три подхода за откриване на прилежащите мутации. Експерименталните резултати показват, че при голям брой копия на мутация T315I, идентифицирането ѝ е възможно и с трите метода. Нискоалелното присъствие на мутация T315I се установява с значително по-висока специфичност и чувствителност при ddPCR метода, като в разработката са доказани два пъти повече пациенти с мутация T315I (11.1% спрямо 5.5% с другите 2 метода). В допълнение към добрата чувствителност та ddPCR методът са дискутирани и други негови предимства: нисък риск от замърсяване, поради автоматизация на процеса; сравнително лесен и бърз за изпълнение метод; дава информация за точния брой на копията с мутация спрямо дивия тип (количествен анализ). Методът се отличава с отлични резултати при откриване на мутации по време на лечение с ТКИ и е препоръчителен за мониторинг на *BCR-ABL* транскрипционни нива при пациенти с ХМЛ, лекувани с инхибитори на тирозин киназа, както и за мониториране на пациенти с ХМЛ с лош отговор от

терапията и негативен мутационен анализ с qPCR тест. Като всеки метод той също има своите недостатъци, които са представени в дискусията. В обсъждането докторантът използва умело и задълбочен литературните си познания, за да обсъди компетентно и критично собствените си резултати.

Изведени и точно формулирани са четири извода, които отразяват резултатите и отговарят напълно на поставените задачи. Съгласна съм с авторската оценка за приносите на дисертационния труд, като от тях бих открила основно тези с приложен характер.

#### **6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта**

Във връзка с дисертацията, докторантът представя 5 публикации, на които е първи автор. Три от тях са от участия в научни конференции. Представените научни трудове покриват напълно тематиката на дисертационния труд и съдържат резултати от проведените изследвания.

#### **7. Автореферат**

Авторефератът е в обем 45 страници като отразява основните раздели и резултати в дисертационния труд.

#### **Заклучение**


Дисертационният труд „Молекулярно-генетични подходи за прогноза и мониторинг на пациенти с хронична миелоидна левкемия“ отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в република България и Регламента за придобиване на ОНС „Доктор“ в МУ - Пловдив.

Трудът утвърждава автора като отговорен и надежден изследовател, който може да провежда самостоятелно научни изследвания и да интерпретира получените резултати.

Всичко това ми дава основание да предложа на уважаваните членове на Научното жури да присъдят образователната и научна степен „доктор“ на Александър Йорданов Линева в докторска програма по „Генетика“.

30 август 2021 г.

Изготвил становището:



Проф. д-р Савина Хаджидекова, д.м.