

## СТАНОВИЩЕ

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
ПЛОВДИВ  
Вх. № *P-7348/1* ... 16. 08. 2021 г.

от проф. д-р Вили Кръстева Стоянова, дм

Медицински Университет, Катедра по Педиатрия и медицинска генетика, Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'  
професионално направление „Биологични науки”, докторска програма „Генетика”

**Автор: Александър Йорданов Линеv**

**Форма на докторантурата:** редовна подготовка

**Катедра:** Катедра Педиатрия и Медицинска Генетика

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

**Научен ръководител:** проф. д-р Вили Стоянова, дм; Медицински Университет - Пловдив, МФ, катедра по Педиатрия и Медицинска Генетика.

Представените документи са в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на МУ – Пловдив.

### 1. Кратки биографични данни за докторанта

Александър Линеv е роден през 1977г. Дипломира се от ПУ „Паисий Хилендарски“ през 2004г. като магистър по Микробни и растителни биотехнологии. От завършването си до момента работи като биолог в Отделението по медицинска генетика на УМБАЛ „Св. Георги“. През 2017г. е зачислен за редовен докторант в катедра „Педиатрия и Медицинска Генетика ” към МУ – Пловдив, докторска програма: „Генетика”. Участва активно в преподавателската и научно изследователната дейност на катедрата. Александър Линеv показва креативност и отговорност, с впечатляваща способност за концентрация върху различни учебни и изследователски задачи. Автор е на редица публикации, както по темата на дисертационния труд, така и свързани с други проблеми в областта на генетиката. Участва в международни и вътреуниверситетски научно-изследователски проекта.

## **2. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи**

Хроничната миелоидна левкемия (ХМЛ) е обект на особено внимание в последните години във връзка с прилагането на таргетно лечение с тирозин-киназни инхибитори (ТКИ), което промени изцяло клиничния ход и прогнозата при това заболяване. С напредъка на медицината ХМЛ се превърна в хронично контролируемо заболяване.

Въпреки успехите, постигнати при терапията на ХМЛ, резистентността все още е проблем. Една от най-честите причини за резистентност е придобиването на мутации в BCR-ABL киназния домен, от които T315I е с най-голямо клинично значение. Изследването на тези мутации предоставя възможност за избор на адекватна терапия за пациентите и за по-добра оценка на риска от прогресия. Предизвикателство за учените са методите за идентифициране на тези мутации.

Емулсионният цифров PCR (ddPCR) е ефективен, високо чувствителен и обещаващ метод за абсолютно количествено определяне на таргетни секвенции. Проучванията за приложението на ddPCR метод за откриване на резистентни към ТКИ мутации при пациенти с ХМЛ все още не са достатъчни. Ето защо считам, че избраната тема е актуална от научна гледна точка и изключително важна за клиничната практика.

## **3. Познаване на проблема**

Представеният литературен обзор от 232 заглавия показва задълбочено и всестранно познаване на проблема. Обзорът дава ясна представа за много добрата информираност на докторанта за всички важни аспекти, имащи отношение към ХМЛ. Детайлно са разгледано съвременното терапевтично поведение при ХМЛ. Направена е подробна литературна справка и критичен анализ на проучванията свързани с методите за анализ на резистентните към ТКИ мутации при пациенти с ХМЛ.

Задълбочените познания по темата са допринесли за точно формулиране на целта на дисертационния труд: Проучване чувствителността и ефективността на нови PCR методи за откриване на мутации в TKD при пациенти с хронична миелоидна левкемия (Ph+), резистентни на тирозин-киназните инхибитори, и тяхното клинично значение при мониториране на терапевтичния отговор при тези пациенти.

## **4. Методика на изследването**

За постигане на целта и изпълнение на поставените 4 задачи са изследвани 90 пациента с ХМЛ, Ph+, проявили резистентност в хода на лечението с 1-во или 2-ро поколение

ТКИ. За изследване на резистентни на ТКИ мутации в BCR-ABL киназния домен при всеки от включените в проучването пациенти са приложени три високо чувствителни PCR базирани метода - RT-qPCR qBiomarker Somatic Mutation; RT-qPCR TaqMan™ Mutation Detection Assays и dd PCR.

С RT-qPCR qBiomarker Somatic Mutation методът пациентите са изследвани за наличието на 6-те мутации в BCR-ABL киназния домен с най-голямо клинично значение: E255K; E255V; Y253H, F359V; F317L и T315I. С другите 2 метода е изследвана само най-честата от тях T315I. С ddPCR метода при 11 пациента с лош отговор от терапията е мониторирана мутация T315I за период от 2 години.

**Резултатите** са представени в хронологичен ред на поставените задачи.

От проведените анализи с RT-qPCR qBiomarker Somatic Mutation метода при изследване на 6 мутации в BCR-ABL киназния домен, при 4 пациента е идентифицирана мутация T315I, а при пети пациент - 2 свързани мутация - T315I и E255K.

TaqMan и castPCR технологията е строго специфична и чувствителна и може да открие редки количества мутантна ДНК в проба теоретично до 0.1%, за която докторантът разработва собствен протокол. Независимо от това, с RT-qPCR TaqMan™ Mutation Detection Assays метода само е потвърдена мутация T315I при същите 5 пациента.

Интересни за резултатите с приложения трети метод - ddPCR. С него не само е потвърдена мутация T315I при 5-те пациента, доказана и с другите 2 метода, но и определен абсолютният брой на мутантните копия на микролитър, който е около или малко по-малко от половината от броя на дивия тип алел. Нещо повече, с ddPCR е идентифицирана мутация T315I и при други 5 пациента, но с много ниски нива на мутантните копия, което доказва по-високата специфичност и чувствителност на ddPCR метода и предимството му в сравнение с другите два метода.

За мониториране на мутация T315I, за период от 2 години, е използван ddPCR методът. Установено е постоянно присъствие на нисък брой копия на мутацията при двама от мониторираните пациенти, което потвърждава, че ddPCR метода е надежден подход за проследяване на динамиката на BCR-ABL1 киназния домен мутации в хода на лечението, поради възможността за доказване на ниското алелното присъствие на мутация T315I.

Получените резултати дават основание на докторанта да предложи ddPCR като препоръчителен метод за ранно идентифициране и абсолютно количествено определяне на резистентни мутации в BCR-ABL1 киназния домен при пациенти с ХМЛ и подходящ за мониторирането им при пациенти с ХМЛ с лош отговор от терапията и негативен мутационен анализ с qPCR тест.

**Обсъждането** е адекватно на получените резултати и в съответствие с литературните данни в последния раздел. Демонстрирана е творческата зрялост на докторанта, който се представя не само като изследовател, отлично владеещ съвременни технологии и методи, но и като личност със задълбочени познания по проблема и способност да анализира научни резултати.

Въз основа на получените резултати са изведени 4 извода, които правилно отразяват съдържанието на дисертационния труд. Те съответстват на поставените задачи и са следствие от формулираната цел на проучването.

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

Дисертационният труд е с класическа структура. Обхваща 94 стандартни страници, онагледен е с 19 фигури и 5 таблици, които са ясни и добре оформени.

Проучването на Александър Лиев е с подчертан приносен характер. За пръв път в България е извършен анализ на мутации в ABL1 гена с цифров емулсионен апарат за полимеразна верижна реакция (ddPCR). Разработен е протокол за високо чувствителен ddPCR базиран метод за детекция на BCR-ABL резистентна мутация T315I при пациенти с ХМЛ. Доказани са предимствата на ddPCR пред други два qPCR метода за ранното откриване на много ниски нива на таргетна ДНК, което допринася за прецизиране на поведението и персонализиране на терапията при пациенти с ХМЛ.

**6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта.** Във връзка с дисертацията са публикувани 3 статии, в които Лиев е водещ автор. Резултатите са представени и на 2 научни форуми. Забелязани са и цитирания.

**7. Автореферат.** Представеният проект за автореферат отговаря на изискванията и отразява точно съдържанието на дисертацията.



## Заклучение

Дисертационният труд на Александър Линеv е посветен на актуален проблем, използвани са съвременни техники и са получени резултати с оригинален и приносен характер. Дисертационният труд показва, че докторантът притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност генетика, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване, което напълно удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и Правилника на МУ – Пловдив за присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР”. Въз основа на всичко това, давам своята положителна оценка за проведеното проучване и препоръчвам на почитаемото научно жури да присъди *образователната и научна степен ‘доктор’* на **Александър Йорданов Линеv** в област на висше образование „Природни науки, математика и информатика”; професионално направление „Биологически науки”; научна специалност „Генетика”.

16.08.2021г.

.....  
проф. д-р В. Стоянова, дм