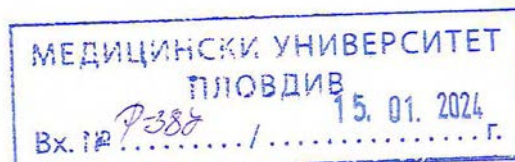


РЕЦЕНЗИЯ

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“

в област на висше образование: 7. „Здравеопазване и спорт“

професионално направление: 7.1. Медицина

по акредитирана докторска програма: „Медицинска генетика“

Автор: д-р Нели Недялкова Митева-Марчева

Форма на докторантурата: редовна

Катедра: Педиатрия и медицинска генетика, МУ-Пловдив

Тема: „Фармакогенетични маркери, асоциирани с лекарствения метаболизъм при пациенти с онкологични заболявания“

Научен ръководител: Проф. д-р Вили К. Стоянова, дм

1. Общо представяне на процедурата и докторантката

Становището е изготвена съгласно Заповед Р-3700/13.12.2023 на Ректора на Медицински Университет – Пловдив.

Представеният комплект материали е в съответствие с чл.70 (1) от I.Раздел. Придобиване на образователна и научна 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
- нотариално заверено копие от диплома за висше образование
- заповеди за зачисляване 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

Докторантката е приложил 3 публикации, от които една е от участие в научна конференция.

Предоставените материали по защитата съответстват на законовите и процедурните изисквания.

2. Кратки биографични данни за докторантката

Докторантката д-р Нели Митева-Марчева през 2015 г. се дипломира като “Магистър” по медицина в Медицински университет Пловдив, а през 2019 г. – придобива специалност по Педиатрия в УМБАЛ „Пълдин“. От 2020 г. до сега е специализирала „Медицинка генетика“ в УМБАЛ „Св. Георги“. От 2019 г. до сега е асистент към Катедра „Педиатрия и медицинска генетика“, МУ-Пловдив.

Кандидатът е съавтор на 6 научни публикации. Участвала е в три национални конференции по спешна педиатрия (2015,2016 и 2017г.), семинар по детска кардиология в Залцбург, конференция по детска ендокринология, ESHG Conference (2022 и 2023). Класирана е на 1-во място за научна разработка на тема "Участие на азотен окис в такрин-индуцирани гладкомускулни реакции" в конкурс "Наука и младост". Докторантката е в научния екип на три научно-изследователски проекта. Член е на БЛС, Българско дружество по генетика и геномика на човека и Дружество на кардиолозите в България. Владее писмено и говоримо английски, испански и руски език.

3. Актуалност на тематиката

Съвременната персонализирана медицина се базира на индивидуална терапия определена въз основа на резултатите от генетични анализи, проведени преди началото на лечението. Персонализираната медицина се основава на изследвания на редки

моногенни дефекти и на полиморфни варианти в гените, които имат отношение към биотрансформацията на лекарствата – резорбция, транспорт, свързване с клетъчни рецептори, метаболизъм, екскреция от организма. Целта е съобразно установените генетични варианти (биомаркери) да се определи правилното лекарство, в правилната доза, в правилното време за правилния пациент.

Настоящият дисертационен труд насочва вниманието към значим здравен проблем – търсенето на индивидуален подход при лечението на пациенти, страдащи от ракови заболявания. Раковите заболявания са широко разпространени, социално значими и заемат важна роля в човешката патология. Според Световната Здравна Организация (СЗО) туморните заболявания са втората причина за смъртност по света. Ефикасността и резултатите от лечението на злокачествените заболявания зависят от различни фактори. Известно е, че ефикасността на едно и също лекарство, прилагано в терапевтична доза по стандартен протокол, е различна между пациентите. Това може да се дължи на различни причини генетични фактори, физиологични/патофизиологични процеси - фактори на околната среда. Варианти в някои гени, могат да обуславят различия между индивидите в скоростта на лекарствената резорбция, транспорт, свързване с клетъчни рецептори, биотрансформация, образуване на активни субстанции и отстраняване от организма. Фармакогенетиката и фармакогеномиката комбинират възможностите на генетиката и фармакологията за проучване на ролята на генетичните варианти за променения отговор на индивида (повишен, намален или липсващ) към действието на лекарства. Появата на секвенирането от ново поколение (NGS – next generation sequencing) съществено промени пейзажа на геномната медицина. NGS технологията има изключителен потенциал за приложение във фармакогеномиката, тъй като позволява анализ на целия геном, екзом или панел от голям брой гени в една реакция бързо, точно и евтино.

4. 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.

Литературният обзор е разработен при използване на литературни източници основно от последните 5 - 10 години. Той е съвременен по съдържание, компетентно и целенасочено насочен към проучвания проблем. В началото на обзора е направена историческа справка за появата, развитието и концепцията на фармакогенетиката. Дискутирана и изчерпателно е разяснена използваната терминология. Накратко са

представени основни понятия от фармакогенетиката и фармакогеномиката като основи на персонализираната медицина.

Докторантката насочено се спира на проблема за генетичната хетерогенност на туморите и значението на молекулния профил на тумора, като база за персонализирана таргетна терапия. Компетентно са представени принципите, възможностите и отделните етапи на различни молекулярни техники за изследване на генетичните маркери на туморите - класическо секвениране, денатурираща високоефективна течна хроматография, едноверижния конформационен полиморфизмен анализ, секвениране от ново поколение (NGS).

Предоставени са данни за честотата на злокачествените заболявания в световен мащаб. Очертани са принципите при лечението на рака като подробно са разгледани най-често използваните химиотерапевтици и тяхната фармакокинетика и динамика. Представени са групите на: флуорпиримидините; иринотекан, платина съдържащи цитостатици; таксани; инхибитори на циклофосфамид; инхибитори на съдовия ендотелен растежен фактор (VEGF инхибитори); етопозид.

Обобщени са литературни данни относно проучвания на генетични биомаркери и таргетна терапия при пациенти с карциноми. На базата на очертаната молекулярна хетерогенност на туморите докторантката представя сполучливо в синтезиран вид данни за нови подходи за таргетна терапия.

В последната част обзорът завършва с обобщение като се подчертава значението на персонализирания подход за осигуряване на ефективност, намаляване на честотата и тежестта на нежеланите лекарствени реакции (НЛР) и максимално запазване качеството на живот на пациентите.

Давам висока оценка на литературния обзор не само заради отличното познаване и анализиране на литературните данни, но и затова, че той показва аналитично мислене и способност за обобщаване.

Литературният обзор е систематизиран и като цяло показва много добро познаване на фактологията, резултатите от многобройните проучвания в тази насока, както и на аналитичните методи. Това е позволило да се формулира целта на проучването и произтичащите от нея задачи.

Цел и задачи на изследването

Целта на дисертационния труд е да се проучат герминативните фармакогенетични варианти, свързани с лекарствения метаболизъм при пациенти с онкологични заболявания.

За изпълнението на целта са поставени следните задачи:

- 1) Да се изолира геномна/свободноклетъчна ДНК от пациенти с недребноклетъчен белодробен карцином (НДКБК), колоректален карцином (КРК), рак на млечна жлеза (РМЖ) и 40 здрави индивиди.
- 2) Да се осъществи таргетно секвениране на панел от гени на изолираните проби.
- 3) Да се определят герминативните фармакогенетични варианти, които са асоциирани с метаболизма на използваните в хода на лечението химиотерапевтици, чрез използване на базата данни „PharmGKB“.
- 4) Да се характеризира честотата и клиничното значение на идентифицираните генетични полиморфизми.
- 5) Оценка честотата на генетични полиморфизми в българската популация спрямо човешката популация.

5. Методика на изследването

Методи

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

1. Изолиране на геномна ДНК от кръв;
2. Изолиране на свободноклетъчна ДНК от кръв;
3. Секвениране от ново поколение (NGS).

ДНК екстракцията е извършена с QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kit за пречистване на геномна ДНК. Изолирането на свободноклетъчна ДНК е направена с BioChain's cfPure® Cell Free DNA Extraction Kit. Изолираната ДНК (геномна и свободноклетъчна) е секвенирана в Novogene Corporation Inc чрез секвениране от ново поколение. Приложен е таргетен панел от 484 гена за идентифицирани на различни генетични вариации сред изследваните пациенти – единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) и инсерции/делеции (INDELs).

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 докторантката има достатъчно молекулярно-биологични познания и използваните методи са подробно описани и обяснени. Приложените методи съответстват на поставените цели и задачи.

Материали

При първоначалната селекция в проучването са включени 140 участника, от които са финално са подбрани 90 лица. От тях 50 са пациенти с онкологични заболявания (26 са диагностицирани с колоректален карцином, 13 с недребноклетъчен белодробен карцином, 11 с рак на млечната жлеза) и 40 са здрави индивиди. Подборът на изследваните пациенти се базира на високата честота на разпространение на карциномите, честотата на нежелани лекарствени реакции сред пациентите, както и терапията със сходни химиотерапевтици, използвани при терапията им.

6. 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 147 страници, в това число: Въведение – 2 стр., Литературен обзор – 44 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 8 стр., Резултати – 29 стр. и Дискусия – 20 стр., Изводи и Приноси - 2 стр., Цитирана литература - 11 стр., Приложения 3 стр. Трудът е онагледен с 15 фигури и 25 таблици в текста. Цитирани са 212 литературни източници и 8 web-базирани източници, всички на латиница.

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

Анализът на резултатите от новогенерационното секвениране е представен в 6 подраздела:

1. Пациенти с колоректален карцином
2. Пациенти с недребноклетъчен белодробен карцином
3. Пациенти с рак на млечна жлеза
4. Пациенти според групи химиотерапевтици
5. Сравняване честотата на генетичните варианти на здрави пациенти от изследваната група с GnomAD (non-cancer patients)
6. Сравняване честотата на установените герминативни фармакогенетични варианти при изследваната група пациенти и здрави с честотата на същите варианти в световната база данни (GnomAD).

Описани са НЛР при групите пациенти с различни видове карциноми. За цялостна оценка на клиничното значение на генетичните варианти, асоциирани с метаболизма на

използваните химиотерапевтици, поради сходство в проведените химиотерапевтични режими при пациентите и за постигане на целите на проучването, участниците са класифицирани в седем групи:

1. Пациенти, лекувани с платина съдържащи химиотерапевтици (Oxaliplatin, Carboplatin, Cisplatin) – 35 пациенти;
2. Пациенти, лекувани с пиримидинови аналози (5-Fluorouracil, Capecitabine) – 26 пациенти;
3. Пациенти, лекувани с фолинова киселина (Leucovorin) – 21 пациенти;
4. Пациенти, лекувани с EGFR-инхибитори (Panitumumab, Cetuximab, Erlotinib) – 11 пациенти;
5. Пациенти, лекувани с таксани (Docetaxel, Paclitaxel) – 15 пациенти;
6. Пациенти, лекувани с антрациклини (Farmorubicin) – 8 пациенти;
7. Пациенти, лекувани с анкилиращи агенти (Cyclophosphamide) – 8 пациенти

При анализа на данните от настоящата работа са установени при повече от един пациент единични нуклеотидни полиморфизми в специфични гени, асоциирани с лекарствения метаболизъм на използваните химиотерапевтици: *MTHFR*, *DPYD*, *CYP1B1*, *XPC*, *ABCG2*, *SLC22A2*, *SOD2*, *EGFR*, *ABCB1*, *ABCC2*, *GSTP1*, *ATM*, *SLCO1B3*, *TP53*, *XRCC1*, *ERCC2*. Установени са 23 герминативни фармакогенетични варианта в 16 гена, асоциирани с метаболизма на използваните химиотерапевтици, водещи до НЛР: *MTHFR* c.1286A>C, *MTHFR* c.665C>T, *DPYD* c.2194G>A, *DPYD* c.1627A>G, *DPYD* c.496A>G, *DPYD* c.85T>C, *CYP1B1* c.1294G>C, *XPC* c.2815C>A, *XPC* c.1496C>T, *ABCG2* c.421C>A, *SLC22A2* c.808T>G, *SOD2* c.47T>C, *EGFR* c.1562G>A, *ABCB1* c.2677T>G, *ABCC2* c.1249G>A, *GSTP1* c.313A>G, *ATM* c.5557G>A, *SLCO1B3* c.334T>G, *SLCO1B3* c.699G>A, *TP53* c.215C>G, *XRCC1* c.1196A>G, *ERCC2* c.2251A>C, *ERCC2* c.934G>A. С по-висока честота сред болните спрямо групата изследвани 40 здрави индивиди са открити 3 герминативни фармакогенетични варианта в 3 гена (*SLC22A2* c.808T>G, *DPYD* c.2194G>A, *XRCC1* c.1196A>G), а спрямо групата здрави в GnomAD се установяват 4 герминативни фармакогенетични варианта в 4 гена (*SLC22A2* c.808T>G, *DPYD* c.2194G>A, *XRCC1* c.1196A>G, *EGFR* c.1562G>A).

С по-ниска честота сред болните в сравнение с групата изследвани 40 здрави индивиди са открити 2 герминативни фармакогенетични варианта в един ген (*XPC* c.2815C>A, *XPC* c.1496C>T), а спрямо групата здрави в GnomAD е открит само един герминативен фармакогенетичен вариант в един ген (*ERCC2* c.934G>A).

С по-висока честота сред българската популация в сравнение със световната са

установени следните 6 герминативни фармакогенетични варианта в 6 гена: *MTHFR c.665C>T*, *DPYD c.2194G>A*, *XPC c.2815C>A*, *EGFR c.1562G>A*, *XRCC1 c.1196A>G*, *ERCC2 c.2251A>C*. С по-ниска честота сред българската популация в сравнение със световната са установени следните 4 герминативни фармакогенетични варианта в 4 гена: *MTHFR c.1286A>C*, *DPYD c.85T>C*, *ABCG2 c.421C>A*, *ERCC2 c.934G>A*.

Изведени и точно формулирани са шест извода, които отразяват резултатите и отговарят напълно на поставените задачи. Съгласна съм с авторската оценка за приносите на дисертационния труд, като за особено ценен от тях намирам установяването в българската популация на честотата на конкретни герминативни фармакогенетични варианти, определящи токсично действие при химиотерапия. Това създава предпоставки за разработването на генетичен панел за пациенти с предстояща химиотерапия за избор на точния медикамент в подходяща доза и минимален риск от НЛР.

8. Преценка на публикациите и личния принос на докторантката

Във връзка с дисертацията, докторантката представя 3 публикации, написани на английски език, на които е първи автор. Две от тях са с висок импакт фактор (IF 8.633; Q1 и IF 1,4; Q4). Една от тях е от участие в научна конференция. Представените научни трудове покриват напълно тематиката на дисертационния труд и съдържат резултати от проведените изследвания. В допълнение дисертантът има 6 постерни участия на Европейската конференция по човешка генетика през 2022 и 2023 година.

9. Лично участие на докторантката

Докторантката е участвала лично в събирането на данните, тяхното обобщаване, анализиране и описание

10. Автореферат

Авторефератът е в обем 68 страници като отразява основните раздели и резултати в дисертационния труд. Той е достатъчно информативен и може да се използва като източник за запознаване с резултатите от проучването и качествата на дисертационния труд.

11. Критични забележки и препоръки

Нямам.

12. Лични впечатления

Нямам.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

NGS – технологията има потенциал да подобри откриването на нови генетични варианти свързани с раковите заболявания, което ще доведе до по-добри решения за лечение и различни подходи за мониторинг. Анализирването на по-голям брой гени би позволило установяването на редки варианти, характерни за българската популация. Разработването на NGS панели, съобразени със специфичния генетичен профил на българската популация, ще позволи разкриването на редки фармакогенетични варианти и разработването на стратегии за индивидуализиране на терапията съобразно генните варианти, оптимизиране на ефикасността и минимизиране на токсичността на лекарствените средства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд „Фармакогенетични маркери, асоциирани с лекарствения метаболизъм при пациенти с онкологични заболявания“ отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на МУ - Пловдив. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на 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 дам положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси и предлагам на почитаемото Научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“ на д-р Нели Недялкова Митева-Марчева в докторска програма по „Медицинска генетика“.

Заличено на основание
Чл.5 §1, б. "В" Регламент (ЕС)2016/679

12 януари 2024 г.

гр. София

Изготвил рецензията:

.....

Проф. д-р Савина Хаджидекова, д.м.