

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на тема "Определяне на варианти, свързани с карциногенеза и фармакогенетични ефекти при рак на бял дроб и щитовидна жлеза" представен за публична защита пред научно жури за присъждане на научната и образователна степен "Доктор" по професионално направление 4.3. "Биологически науки", научна специалност "Генетика"

Автор на дисертационния труд: Зора Акрам Хамуде, задочен докторант в Катедрата по медицинска генетика, МФ, МУ- София

Рецензент: професор д-р Стоян Ганчев Лалчев, дм, МУ- София

Биографични данни за докторантката

Зора Акрам Хамуде е следвала в Хашамитския Университет, Зарка, Йордания в периода 2002-2006 г. и е придобила бакалавърска степен „Биотехнология“. Магистратура „Генно и клетъчно инженерство“ е изучавала в периода 2007-2009 г. в Биологическия факултет на Софийския университет. Работи в Катедрата по медицинска генетика от 2012 г. като биолог и в МБАЛ „Токуда“ като биотехнолог по граждански договор. Владее английски и арабски език.

Член е на Българското дружество по генетика и геномика на човека и на Европейското дружество по човешка генетика.

Актуалност на проблема

Дисертационният труд на Зора Хамуде е посветен на значим научно-приложен проблем – търсенето на туморни генетични маркери и нови подходи при терапията на пациенти със злокачествени заболявания, които са широко разпространени, социално значими и заемат важно място в човешката патология.

В постгеномната ера активно се търсят главните кандидат гени за различните типове ракови заболявания. Макар и в начална фаза тези изследвания дават обещаващи резултати за разбиране патогенезата им и въвеждането на подходящи подходи за

индивидуализирана химио и таргетна терапия. За целта е необходимо предварително да се познава молекулния профил на тумора. Избора на подходяща терапия изисква да се съобразяват и генетичните особености на пациентите, в частност носителство на фармакогенетични маркери, които могат да обуславят неефективно лечение или тежки странични реакции. Индивидуализирането на лечението е от основно значение за осигуряване на ефективност и максимално запазване качеството на живот на пациентите.

Секвенирането от ново поколение (NGS – next generation sequencing) съществено промени възможностите на молекулната медицина. NGS технологията има изключителен потенциал за приложение във фармакогеномиката, тъй като позволява анализ на целия геном или панел от голям брой гени едновременно, бързо, точно и евтино.

Казаното по-горе очертава несъмнената актуалност на предприетото проучване, което ще даде допълнителни познания за раковия геном и насоки за подобряване на терапията на рака на белия дроб и щитовидната жлеза

Структура и оформление на дисертационния труд

Рецензираният дисертационен труд е оформен съгласно изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ и е с общ обем 147 страници с добро пропорционално разпределение на основните раздели: литературен обзор - 31 страници, материали и методи – 26 страници, резултати -27 страници, обсъждане – 33 страници, изводи и приноси – 2 страници.

Библиографията включва 228 литературни източника на английски език. Анализирани са проблеми, както и резултатите от собствените проучвания са много добре онагледени със 17 таблици и 30 фигури.

Литературен обзор

Литературният обзор е разработен при използване на литературни източници основно от последните 5- 10 години. Той е съвременен по съдържание, компетентно и целенасочено визиран към проучвания проблем.

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

Добре са очертани генетичните основи на рака като е маркирано значението на онкогените, туморсупресорните гени, механизмите за активацията им и ролята на епигенетичните механизми за регулация на генната активност.

Докторантката насочено се спира на проблема за генетичната хетерогенност на

туморите и значението на различните молекулярни маркери - соматични и герминативни мутации, полиморфизми, промени в метилирането на ДНК и ролята на микроРНК-ите за повлияване на генната експресия. Подчертава се значението на молекулния профил на тумора, като база за персонализирана таргетна терапия.

Компетентно и стегнато са представени принципите, възможностите и отделните етапи на различните техники за изследване на генетичните маркери на туморите- класическо секвениране, FISH анализ, секвениране от ново поколение (NGS), метод на микрочип-базираната сравнителна геномна хибридизация(array-based CGH), полимеразно верижна реакция в реално време (real-time PCR).

На базата на очертаната молекулярна хетерогенност на туморите докторантката представя сполучливо в синтезиран вид данни за нови подходи за таргетна терапия. Представени са групите на: малките молекулярни инхибитори, моноклоналните антитела, принципите на действието им, страничните ефекти, както и появата на резистентност в резултат на клонална селекция на туморните клетки. Отделено е място и за антисенс терапия, като подход целящ потискане на активираните онкогени и прекъсване на информационния поток в клетките.

В последната част на обзора са представени данни от литературата относно проучвания на генетични биомаркери и таргетна терапия при пациенти с рак на белия дроб и щитовидната жлеза. Приведени са доказателства от клинични проучвания относно редица гени - мишени за прицелна терапия, като – EGFR, ALK, KRAS, BRAF, ROS1, RET и др.

Това показва много добро познаване от страна на докторантката на фактологията и резултатите от многобройните проучвания в тази насока.

Обзорът завършва с обобщение, като се подчертава значението на изследването на генетичните маркери с NGS технологията за разработване на ефикасна лечебна стратегия на туморните заболявания при намалени странични ефекти и съхраняване качеството на живот на пациентите.

Литературният обзор е центриран към планираните проучвания и като цяло показва добро познаване на проблема, аналитично мислене и способност за обобщаване. Това е позволило да се формулира целта на проучването и произтичащите от нея задачи.

Цел и задачи на дисертацията

Да се характеризират генетични варианти при два типа карциноми – недребноклетъчен белодробен карцином (НДКБК) и фамилен папиларен тироиден

карцином (ФПТК) с TruSight Cancer panel и да се определят фармакогенетични дефекти, свързани с ефективността на химиотерапията и прицелната терапия с тирозин киназни инхибитори.

Задачи

1. Да се секвенират с TruSight Cancer Sequence panel туморни ДНК проби от пациенти с НДКБК ;
2. Да се характеризира типа, честотата и клиничното значение на генетичните варианти при НДКБК и да се определят фармакогенетични варианти, свързани с ефективността на химиотерапията чрез използване на базата данните «PharmGKB»;
3. Да се секвенират с TruSight Cancer Sequence panel ДНК проби, изолирани от периферна кръв на пациенти с ФПТК;
4. Да се характеризира типа, честотата и клиничното значение на генетичните варианти при ФПТК и да се определят фармакогенетични варианти, свързани с ефективността на химиотерапията чрез използване на базата данните «PharmGKB»;
5. Да се характеризират с PCR в реално време типовете мутации в EGFR гена в туморни ДНК проби от пациенти с НДКБК за избор на подходяща таргетна терапия.

Материали и методи

В проучването са включени общо 581 пациенти. От тях 569 с недребноклетъчен белодробен карцином (НДКБК) и 12 пациенти от четири семейства с фамилна форма на папиларен карцином на щитовидната жлеза (ФПТК)

За изпълнение на поставените задачи докторантката е усвоила и успешно е приложила следните съвременни, високорезолютивни молекулярно - генетични методи за: екстракция на геномна ДНК, ДНК секвениране от ново поколение (NGS) и полимеразно верижна реакция в реално време (Real-time PCR). Отделните етапи на приложените методи са детайлно описани и онагледени в този раздел, което позволява възпроизводимост на резултатите.

Общо 30 проби (от 12 пациента с папиларен карцином на щитовидната жлеза и 18 пациенти с НДКРБД) са секвенирани с TruSight Cancer панел на MiSeq секвенатор на Illumina. Панелът включва 94 гена за диагностика на мутации, свързани с предразположеност към различни видове злокачествени заболявания. За ДНК секвениране е използван протокол на фирмата.

В панела също така са включени 284 SNPs, за които големи проучвания са показали, че са асоциирани с рак. Броят на таргетните екзони е над 1700, като общият таргетен район на панела е 255 Kb.

Данните от секвенирането са обработени с подходяща програма - Softgenetics NextGene Software (версия 2.3.3), като намерените варианти са анализирани със софтуерни продукти - PROVEAN, SIFT и PolyPhen-2 за да се изследва възможния ефект върху кодираните протеини. Допълнително вариантите са проверени за фармакогенетични ефекти на SNPs варианти от базата данни - PharmGKB . Зависимостите между мутациите в EGFR гена и хистологичния тип на туморите, пола на пациентите и тютюнопушенето са тествани с непараметричния статистически анализ

Резултати и обсъждане

При секвенирането с TruSight Cancer панел на 18 проби от пациенти с НДКРБД при 11 от тях са установени общо 21 патогенни SNPs варианта, групирани в 7 типа в 4 от изследваните 94 гена в онкопанела. От тях 3 типа SNPs са в туморсупресорния ген BRCA1, два в ген PALB2 и по един в гените PMS2 и MLH1. Оценката на патогенността им е осъществена със софтуерни продукти позволяващи оценка на мутациите върху функцията на кодираните протеини (http://provean.jcvi.org/about.php#about_1)

Паралелно установените при секвенирането варианти са анализирани за потенциални фармакогенетични ефекти свързани с химиотерапията. Сравнени са с подходяща референтна база данни за алелните честотите в европейска популация. От общия брой варианти, 54 на брой са установени 5 типа, които имат отношение към ефекта на различни противотуморни препарати. Тези варианти са регистрирани в 4 от гените в онкопанела - ERCC2, TP53, XPC и EGFR. Докторантката привежда интересни данни за ефекта от носителството на тези варианти в хомо или хетерозиготно състояние и терапията с определени химиотерапевтици.

При 551 пациенти с НДКРБД е анализиран мутационния спектър на *EGFR* гена чрез експресионен PCR анализ в реално време. Вида на *EGFR* мутациите в туморните проби е определен чрез теста „*therascreen EGFR assay*“, с който се изследват 29 мутации в гена. Установени са генни мутации в *EGFR* в 10% от изследваните туморни проби с НДКБК. Според типа на мутациите най-висока е честотата на делециите в екзон 19 - 56.40%, следвани от мутацията L858R в екзон 21 - 36.40%. Проведения генотипно-фенотипен анализ показва по-висока честота на мутациите при жени, непушачки и при хистологичен тип- аденокарцином.

Интересни резултати са получени от проведеното NGS секвениране с карциномен панел на 12 пациента от четири фамилии с ФПТК. Установени са 8 типа

патогенни варианти в 3 от гените в панела (*MET*, *RET*, *MLH1*). Чрез секвениране с карциномния панел са определени фармакогенетичните варианти при ФПТК.

Намерени са 6 типа фармакогенетични варианти при общ брой 45 срещан в 12-те изследвани пациенти. Тези полиморфни варианти са локализирани в 6 гена - *ERCC2*, *TP53*, *XPC*, *EGFR*, *ERCC5* и *RET*. Откритите генетични варианти са подложени на анализ за ролята им като евентуални фармакогенетични варианти свързани с терапията със специфични химиотерапевтици.

Получените резултати от проучванията са документирани прецизно, с таблици и фигури. Резултатите са обсъдени компетентно и сравнително с известните литературни данни, като докторантката прави адекватни интерпретации и заключения, което е показател за добри умения за боравене с научните факти.

Дисертацията и автореферата са написани на добър научен български език и показват много добро познаване на разработвания проблем. Освен отделни правописни грешки и технически пропуски, нямам съществени забележки, които да се отразяват на резултатите и направените изводи от проучването.

Изводи

В заключителната част на дисертационния труд дисертантката прави кратко обобщение на постигнатите резултати и формулира 6 основни извода, които приемам като съответстващи на представените данни и тяхното значение за терапията на пациентите с разглежданите онкологични заболявания.

1. В групата на пациентите с НДКБК са установени седем патогенни варианта в онкогените, включени в панела: в *BRCAl*(rs16941, rs80356964 и rs1799950), в *PMS2*(rs146176004), в *PALB2*(rs75023630 и rs45551636) и в *MLH1*(rs63751049).

Доказани пет фармакогенетични варианта в 4 от 94-те включени в панела гени: в *TP53*(rs1042522), в *XPC*(rs2228001), в *EGFR*(rs2227983), в *ERCC*(rs1799793 и rs13181).

2. Установено е, че активиращите мутации в *EGFR* гена са по-чести при жените с НДКБК и при аденокарциномите като хистологичен тип.

3. Регистрирана е по-ниска обща честота на мутациите в *EGFR* гена при българските пациенти (10%) в сравнение със средната за Европа (17%). Наблюдаваното различие е главно за сметка на по-ниския процент делеции в екзон 19.

4. В три от изследваните 94 гена, свързани с туморогенезата в кръвни проби на пациенти с ФПТК са установени осем патогенни варианта. Два от тях са описани в литературата (потвърдителен принос)- rs56391007 в *MET* и rs181856591 в *RET*, а шест

са нови, непубликувани в литературата варианти в гените *MET* и *MLH1* (съответно(NP_001120972.1:p.Leu1080Met, NP_001120972.1:p.Phe1234Ser, NP_001120972.1:p.Pro712Gln, NP_001120972.1:p.Ser823Tyr; и NP_000240.1:p.Glu23Gly, NP_000240.1:p.Gly634Val във втория ген).

5. При секвенирането с онкопанела TruSight Cancer на пациенти с НДКБК или ФПТК от общо 7800 установени варианти са доказани 7 фармакогенетични варианти. От тях 4 се откриват при двата типа карциноми - rs1042522 в *TP53*, rs2228001 в *XPC*, rs2227983 в *EGFR* и rs1318 в *ERCC2*.

Научни приноси

Дисертационният труд има редица приноси с теоретично и научно-приложно значение, които съответстват на получените данни и които приемам без възражения:

- установени са фармакогенетични варианти в онкогени и туморсупресорни гени, които асоциират положително с неефективна цисплатинова терапия и намалена преживяемост.
- открити са шест нови, неописани в литературата, патогенни варианти при пациенти с фамилен папиларен тиреоиден карцином.
- регистрирана е по-ниска честота на мутациите в гена за *EGFR* сред българските пациенти в сравнение със средните за Европа, главно за сметка на делециите в екзон 19.
- предварително тестиране с панела TruSight Cancer Sequence може да се използва за планиране на оптимална терапия при наличие на фармакогенетични варианти предразполагащи към неефективна химиотерапия с цисплатина или изразен токсичен ефект от нея.

Автореферат

Авторефератът отразява основните раздели на собствените разработки. Той е достатъчно информативен и може да се ползва като източник за запознаване с резултатите от проучването и достойнствата на дисертационния труд.

По дисертацията докторантката има 3 публикации на английски език в списания с импакт фактор, като в 2 от тях тя е първи автор. Резултати от докторската си работа е представила на 6 международни конгреса.

Заключение

Считам, че дисертационният труд на Зора Акрам Хамуде отговаря на всички

изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за неговото приложение. Разработваният проблем е актуален и с подчертана научна и практическа значимост.

Използвани са съвременни изследователски методи за откриване на мутации и полиморфизми в гени свързани с онкогенезата и фармакогенетиката.

Получените резултати са обработени с подходящи методи на биоинформатиката и статистиката. Те са с определен приносен характер и намерили са място в периодичния медицински печат и са представени на научни международни форуми. Това ми дава основание убедено да препоръчам на научното жури да предложи присъждане на научната и образователна степен „доктор” наддоктораантката *Зора Акрам Хамуде*.

30.10.2018 г.

Рецензент:

(Проф. д-р Ст. Лалчев, дм)

