

## РЕЦЕНЗИЯ

от

**проф. д-р Вили Кръстева Стоянова, дм**

Катедра Педиатрия и Медицинска генетика, МУ - Пловдив

на дисертационен труд на **Зора Акрам Хамуде** на тема: **“Определяне на варианти, свързани с карциногенеза и фармакогенетични ефекти при рак на бял дроб и щитовидна жлеза”** представен за присъждане на образователната и научна степен 'доктор' в област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”, Шифър 4.3., Професионално направление: „Биологически науки”, Научна специалност: „Генетика”

Научни ръководители: **Проф. Д-р Драга Тончева, дбн**

**Доц. Д-р Савина Хаджидекова, дм**

Със заповед на Ректора на МУ- София № РК36-2403/08.10.2018г. съм определена за член на научното жури.

### **Биографични данни за докторанта**

Зора Хамуде получава бакалавърска степен по специалността „Биотехнология“ в Хашемитски Университет, Зарка (Йордания) през 2006г и магистърска по „Генно и клетъчно инженерство“ в Биологически факултет на Софийски университет “Св. Климент Охридски” през 2009г. От 2009г. работи като биолог в Катедра „Медицинска генетика“ на МФ, Медицински Университет – София и като биотехнолог в УМБАЛ „Acibadem City Clinic Токуда Болница“, гр. София.

Докторантката има опит с редица съвременни молекулярногенетични техники: сравнителна геномна хибридизация върху микрочипове; биохимични техники; изолиране на ДНК; ДНК амплификация, рестрикция и агарозна електрофореза; ДНК секвениране; работа с PCR.

Дисертационният труд е добре и логично структуриран. Представен е в 147 стандартни страници, от които 125 страници основен текст, разпределени както следва: въведение –

2 стр., литературен обзор – 32 стр., цел и задачи – 1 стр. материали и методи – 27 стр., резултати - 28 стр., обсъждане, заключение, изводи и приноси – 35 стр. Литературната справка обхваща 228 източника. Дисертацията съдържа 30 фигури и 17 таблици, които са ясни и добре оформени.

### **Актуалност на тематиката**

Прецизираната медицина е иновативен подход, който предлага възможности за поставяне на прецизирана диагноза, извършване на превенция, ефективно лечение на тежки болести (редки и социално-значими) и намаляване на нежелани лекарствени реакции и неефективни терапии.

Персонализираната медицина е нова концепция за таргетна терапия на определена група пациенти, която за избор на лечение и мониториране на ефекта от терапията използва молекулярни биомаркери. Прицелното лечение има потенциал за подобряване на медицинските резултати, намаляване на страничните лекарствени реакции при пациентите и намаляване на разходите за неефективно или ненужно лечение. Геномните анализи предлагат огромни възможности за персонализирано лечение и за постигане на по-добри терапевтични ефекти.

Дисертационният труд на Зора Хамуде е посветен на проучване варианти, свързани с карциногенеза и фармакогенетични ефекти при рак на бял дроб и щитовидна жлеза с цел по-ефективна и по-безопасна терапия. Като се има предвид социалната значимост, високата популационна честота на раковите заболявания и високата смъртност от тях, търсенето на нови подходи при лечението на пациенти, страдащи от злокачествени заболявания е несъмнено актуално.

### **Познаване на проблема**

Литературният обзор е изчерпателен, с конкретни данни по дискутираната тема. Направен е подробен и критичен анализ на приноса на фармакогенетиката и фармакогеномиката за развитие на персонализирана медицина, чиято основна концепция е поставяне на прецизна диагноза, мониториране на болестния процес и определяне на ефективно лечение на базата на пациентския геном.

Задълбочено и информативно са представени генетичната природа на рака и сложните генетични механизми на този процес; значението на генетичните биомаркери при злокачествени тумори и молекулярните подходи за тяхното идентифициране.

Детайлно са разгледани новите подходи при лечение на рак. Появата на таргетната терапия в последните десетилетия доведе до прелом в цялостната концепция за противораково лечение, а разработването на системата CRISPR е нов мощен подход за борба с рака чрез коригиране или отстраняване на една или повече части от генома.

Специално внимание е отделено на генетичните биомаркери и таргетната терапия при недребноклетъчен белодробен карцином (НДКРБ) и папиларен тироиден карцином (ПТК).

Задълбочените познания по темата са допринесли за точно формулиране на целта на дисертационния труд: 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. Задачите са логично и последователно поставени и съответстват на целта на проучването.

### **Методика на изследването**

В изследването са включени общо 581 пациенти. От тях 569 пациенти са диагностицирани с НДКБК в продължение на пет години и 12 пациенти от четири семейства с фамилна форма на папиларен карцином на щитовидната жлеза

Анализите са извършени с подходящо подобрени и подробно описани съвременни молекулно-генетични методи – ДНК секвениране от ново поколение (NGS) и полимеразна верижна реакция в реално време (Real-time PCR), които позволяват постигане на поставената цел.

За ДНК секвениране е използван секвенционен панел - TruSight Cancer на Illumina, който включва 94 гена за диагностика на мутации, свързани с предразположеност към различни видове ракови заболявания и 284 SNPs асоциирани с рак. Приложените широка гама софтуерни програми и бази данни за филтриране на вариантите и оценка на



функционалните последици са доказателство за уменията на докторантката да анализира и интерпретира генетичните данни, получени с NGS технологията.

PCR в реално време е приложен при 551 туморни проби на пациенти с НДКРБД за определяне на 29 соматични мутации в екзони 18-21 на EGFR гена чрез две технологии: ARMS и Scorpions.

С подходящи статистически методи е направена оценка на връзката между мутациите в EGFR гена и пола, статуса на пушене (пушачи и не-пушачи) и хистологичния туморен фенотип (аденокарцином, сквамозноклетъчен карцином и едро клетъчен карцином).

## Резултати

Данните от извършените генетични изследвания са подходящо систематизирани. От изследваните с NGS 18 туморни проби от НДКБК са установени седем типа патогенни SNP-варианти свързани с туморогенезата в гените *BRCA1*, *PMS2*, *MLH1* и *PALB2*, общо 21 на брой, разпределени в 11 пациента.

При анализ на данните от NGS секвенирането на кръвни проби от пациенти с ФПТК са определени 8 патогенни варианти в 3 гена свързани с туморогенезата (*MET*, *RET*, *MLH1*), 6 от които са нови варианта, непубликувани в литературата. От 12 пациенти с ФПТК, 9 са носители на патогенни варианти. От тях 5 пациента имат повече от 1 мутантен ген.

Представена е детайлна информация за типа, честотата и клиничното значение на всеки от патогенните варианти при НДКБК и ФПТК.

Приветствам идеята за проучване на потенциалната роля на установените при секвенирането варианти като фармакогенетични дефекти при химиотерапия, което е от значение за терапевтичния отговор, преживяемостта и риска от нежелани лекарствени реакции (НЛР). При секвениране с панел TruSight Cancer на пациенти с НДКБК или ФПТК от общо 7800 установени варианти са доказани 7 фармакогенетични варианти. При НДКБК са доказани пет фармакогенетични варианта в четири от 94-те изследвани гена - *TP53*, *XPC*, *EGFR*, *ERCC2*, а при ФПТК - шест SNP варианта в шест гена - *TP53*, *ERCC2*, *RET*, *EGFR*, *XPC* и *ERCC5*. Четири от тези варианта (*rs1042522* в *TP53*, *rs2228001* в *XPC*, *rs2227983* в *EGFR* и *rs1318* в *ERCC2*) се откриват и при двата типа

карциноми. Резултатите са интерпретирани компетентно - показател за добрите умения за боравене с научните факти.

В допълнение е определен мутационен спектър на *EGFR* гена за избор на таргетна терапия на НДКБК. Идентифицирани са генни мутации в *EGFR* в 10% от изследваните туморни проби с НДКБК (n=55). Доказана е най-висока честота на делециите в екзон 19 - 56.40% (n=31), следвани от точковата мутация L858R в екзон 21 - 36.40% (n=20).

Направен е анализ на фенотип/генотип корелациите. Установено е, че активиращите мутации в *EGFR* гена при пациенти с НДКБК са по-чести при женски пол, при аденокарциноми в сравнение плоскоклетъчни или/и едроклетъчни карциноми и при непушачи. Сравнена е честотата на всяка от мутациите в *EGFR* гена в българска популация спрямо средната за Европа. Данните от проучването показват, че българската популация има по-ниска обща честота на мутациите в *EGFR* гена в сравнение със средната за Европа за сметка на делециите в екзон 19.

Резултатите са дискутирани и съпоставени с литературните данни в последния раздел „Обсъждане“. Демонстрирана е творческата зрялост на докторантката, която се представя не само като изследовател, отлично владеещ съвременни иновативни 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 6 извода, които правилно отразяват съдържанието на дисертационния труд. Те съответстват на поставените задачи и са следствие от формулираната цел на настоящото проучване.

Дисертацията е разработена на много високо ниво, а получените резултати могат да бъдат използвани за решаване на проблеми от практическа значимост: секвениране на ДНК-и от туморни проби с TruSight Cancer Sequence панел за определяне на соматични фармакогенетични варианти, свързани с неефективна платина базирана химиотерапия; секвениране на ДНК-и от кръвни проби с TruSight Cancer Sequence панел за определяне на герминативни фармакогенетични варианти, определящи токсично действие при химиотерапия.

Научната стойност на дисертационния труд е в това, че насочва вниманието към изследване на онкогените и туморсупресорните гени не само за патогенни варианти, но и



за фармакогенетични варианти, които имат отношение към ефекта от химиотерапията при пациенти с НДКБК и с фамилна предразположеност към тироиден карцином.

Във връзка с дисертацията са публикувани 3 статии, в които Зора Хамуде е водещ автор. Резултатите са докладвани и на 6 международни конгреса.

Нямам съществени критични забележки към дисертационния труд.

Представеният автореферат отговаря на изискванията и отразява точно съдържанието на дисертацията. Той е достатъчно информативен, може да се ползва като източник за запознаване с резултатите и достойнствата на проучването.

**Заключение.** Зора Хамуде представя за защита отлично оформен дисертационен труд, с който се представя като изграден специалист в областта на медицинската генетика и молекулярна биология, зрял научен работник способен сам да провежда изследвания на високо научно ниво и да анализира сложни научни резултати. Със своите постижения тя напълно удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и Правилника на МУ – София за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”.

Въз основа на гореизложеното, като член на научното жури давам своята положителна оценка за проведеното проучване, представено от дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси и убедено препоръчвам на почитаемото научно жури да присъди *образователната и научна степен ‘Доктор’* на **Зора Акрам Хамуде** в област на висше образование „Природни науки, математика и информатика”; професионално направление „Биологически науки”; научна специалност „Генетика”.

22.10.2018г.

подпис:

проф. д-р Вили Кръстева Стоянова, дм

