

СТАНОВИЩЕ

ОТ ПРОФ. Д-Р ПЕТРАНКА ТРОЯНОВА, ДМ,
Професор по научната специалност „Онкология”, Професионално направление 7.1.
Медицина, Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт,
към Катедрата по нуклеарна медицина, лъчелечение и медицинска онкология,
на Медицински факултет, Медицински университет – София,
член на научното жури въз основа на заповед № Р-109-111/ 11.03.2022 г.
на Ректора на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“- Варна

Относно: Публична защита на дисертационен труд на **Д-р Ростислав Радославов Манев** за придобиване на ОНС „Доктор“ в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, Професионално направление 7.1. Медицина, по докторска програма „Онкология”, с тема на дисертационния труд „ЕДИНИЧНИ НУКЛЕОТИДНИ ПОЛИМОРФИЗМИ В ГЕНИТЕ ЗА НЕКОДИРАЩИ РНК-И КАТО ДИАГНОСТИЧНИ И ПРОГНОСТИЧНИ МАРКЕРИ ПРИ БОЛНИ С КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ В МЕТАСТАТИЧЕН СТАДИЙ”

I. Кратки данни за кариерното развитие на кандидата

Д-р **Ростислав Манев** е роден на 31.05.1991 г. През 2016 г. завършва висше образование по медицина в Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна.

От 2016г до момента е лекар-специализант в УМБАЛ ”Света Марина”- Варна по клиничната специалност „Медицинска онкология”.

От 2017г. до днес д-р Манев е асистент към Катедрата по пропедевтика на вътрешните болести и Катедрата по онкология и провежда практически занятия по учебната дисциплина „Онкология”.

През 2018 г. със заповед на Ректора на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“- Варна д-р Манев е зачислен за докторант в редовна форма на обучение в Катедрата по пропедевтика на вътрешните болести (по късно Катедра по онкология) към факултет „Медицина”, МУ-Варна с научни ръководители доц. д-р Николай Цонев, д.м и доц. Мария Раданова, д.б.

Д-р Манев проявява подчертан афинитет към научно-изследователска работа. Има участия в национални и международни научни събития. Във връзка с разработвания дисертационен труд д-р Манев е представил 11 научни публикации, от които 8 в реферирани издания с импакт фактор.

Документите на д-р Манев отговарят на законовите изисквания за развитие на академичния състав на ЗРАСРБ в Република България и Правилника за РАС на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна. Подредени са добре и съдържат достатъчно доказателствен материал.

II. Актуалност на дисертационния труд

През последните години броят на честотата на колоректалния карцином (КРК) се увеличава драстично, а развитието на диагностичните методи, хирургичното лечение и прилагането на индивидуални алгоритми за противотуморно лечение значително подобряват качеството на живот и общата преживяемост при болните с това заболяване.

През последните три десетилетия чрез обширни геном-асоциирани проучвания се изследва значението на единичните нуклеотидни полиморфизми (single nucleotide polymorphisms, SNPs), като фактори, които са пряко свързани с риска от развитие на

солидни тумори с различни първични локализации, включително и КПК. SNPs са често срещана генетична вариация, която може да даде отражение на различни функционални процеси, засягащи индивидуалната чувствителност към определени онкологични заболявания и по този начин SNPs могат да се разглеждат като биомаркер за прогнозиране на риска от рак. Единични нуклеотидни полиморфизми в гените на микрорибонуклеиновите киселини (миРНК) - miR-SNPs са в състояние да модулират експресията на миРНК и така да повлияват риска за развитие на карцином, ефикасността на лечението и прогнозата за пациента.

Микрорибонуклеиновите киселини (миРНК) са РНК-молекули с дължина от около 22 нуклеотида, които играят важна роля в различни биологични процеси, като ембрионално развитие, клетъчна диференциация, пролиферация, апоптоза, инсулинова секреция и онкогенеза и др. МиРНК не кодират протеини, но имат важна функция за регулиране на генната експресия. Все по-голям брой изследвания показват, че миРНК играят важна роля в развитието на рака чрез регулиране на експресията на протоонкогени или туморни супресорни гени. Последни проучвания показват различни нива на експресия на миРНК в биологични продукти като тъкани и серум при пациенти с рак и здрави индивиди.

Съвременните изследвания относно потенциалната диагностична, предиктивна и прогностична роля на miR-SNPs са малко на брой, а за българската популация не са провеждани до сега. Ето защо изследванията за наличие на функционални генетични варианти в гените на некодиращи РНК-и са особено важни и правят разработвания дисертационен труд изключително интересен и актуален.

III. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд съдържа 127 стандартни страници и е онагледен с 40 таблици и 35 фигури. Литературната справка включва 257 литературни източника, от които 3 на кирилица и 254 на латиница.

Целта на изследването е дефинирана правилно и дава основните насоки да изследователския труд – да се идентифицират нови диагностични и прогностични молекулярно-биологични биомаркери при български пациенти диагностицирани с КПК в метастатичен стадий чрез изследване за наличие на пет подбрани единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) в гените, кодиращи микро-РНК-и – **rs7372209** в гена за микро-РНК-26a-1, **rs2910164** в гена за микро-РНК-146a, **rs2682818** в гена за микро-РНК-618, **rs353293** в промоторния район на генния клъстер за микро-РНК-143 и микро-РНК145 и **rs322931** в гена за микро-РНК-181b.

За постигането на целта са формулирани точно и ясно 7 задачи:

- Да се конструира и характеризира детайлно българска кохорта за изследване за наличие на пет подбрани SNPs, като се селектират пациенти с КПК в метастатичен стадий, провели първа линия лечение, да се стратифицират по демографски и клиникопатологични показатели, да се проследят за отговор от проведената терапия и се подбере и характеризира контролна група здрави индивиди, сходни по демографски показатели с пациентите.
- Да се изследва алелното разпределение и генотипната честота на петте подбрани SNPs в селектираната кохорта пациенти с метастатичен колоректален карцином.
- Да се сравнят алелните и генотипните честоти на подбраните пет SNPs в българската група здрави индивиди с наличните данни за други кохорти.
- Да се потърси асоциация между носителството на определен генотип/алел на изследваните пет SNPs в гените за микро-РНК-и и възможността да предскажат риск от развитие на КПК.

- Да се потърси асоциация между носителството на определен генотип/алел на петте изследвани SNPs в гените за микро-РНК-и и общата преживяемост при пациентите.
- Да се сравнят нивата в плазмата на микро-РНК-ите, в чийто гени са изследваните SNPs, при пациентите с мКРК и при здравата контролна група.
- Да се потърси асоциация между нивата на експресия в плазмата на микро-РНК-ите, в чийто гени са изследваните SNPs, и общата преживяемост при пациентите.

В дисертационния труд е направен подробен, аналитичен литературен обзор, обхващащ най-съвременните разработки, който доказва актуалността на темата и ползата от неговото разработване. До сега наличните изследвания, изучаващи значението на единичните нуклеотидни полиморфизми (single nucleotide polymorphisms, SNPs), като фактори, които са пряко свързани с риска от развитие на КРК са относително малко и ограничени, поради което са необходими нови проучвания за анализ на асоциацията между изследваните SNPs със КРК.

В разработения дисертационен труд са приложени съвременни клинични, диагностични, епидемиологични и статистически методи, които са достатъчни за решаване на поставените задачи за постигане на научната цел. Изследването е одобрено от Комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна.

Проучването обхваща 101 болни с неоперабилен, метастатичен карцином на дебелото черво, провеждали първа линия флуоропиримидин базирана химиотерапия или в комбинация с анти-VEGF или с анти-EGFR таргетна терапия в университетска болница „Света Марина“-Варна, стадирани с СТ или PET/СТ преди започване на лечението, с адекватни лабораторни показатели като ПКК, бъбречна и чернодробна функция и ECOG PS – пърформанс статус < или = 2, както и контролна група от 90 здрави доброволци, с възраст и пол, съответстващи на пациентите, без роднини по права линия с анамнеза за рак на дебелото черво и клинични данни за друго заболяване. Болните с КРК са проследени в рамките на 36 месеца. В хода на проследяването пациентите са рестадирани на всеки 3 месеца (12 седмици) чрез използването на образни методи (КТ и PET/КТ).

Анализирана е медицинската документация, рутинните клинични изследвания и биологичните маркери, както и приложеното лечение. Основен фокус на дисертационната работа е изследването за наличие на единични нуклеотидни полиморфизми в гените за некодиращи миРНК-ки като диагностични и прогностични биомаркери при подобрите пациенти, във връзка с което са приложени специфични методи за изследване като:

ДНК екстракция - от плазма от пациентите и здравите контроли с помощта на DNeasy Blood & Tissue Kit; **SNP генотипиране** - TaqMan SNP анализ (TaqMan® Assays SNP Genotyping, ThermoFisher Scientific) за определяне наличието на полиморфизми в гените за подобрите микро-РНК-и и PCR анализ (Real Time PCR System, Applied Biosystems, 7500); **Изолиране на РНК от плазма за изследване на микро-РНК-и** - използван кит Macherey-Nagel, Düren, Germany; **Изследване нивата на експресия на циркулиращи в кръвта миРНК-и, включително: cDNA синтеза** - използван е кит RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) и **qPCR реакция** - количествен PCR анализ е осъществен с AmplifyMe SG Universal Mix (AM02, BLIRT, Poland), на апарат ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA).

Използвани са генетични модели на унаследяване за анализ на асоциацията на изследваните SNPs със КРК (А – вариантен алел, В – див тип) – Алели (А/В), Рецесивен (АА/ВВ+АВ), Доминантен (АА+АВ/ВВ), Кодоминантен (АВ/ВВ; АА/ВВ), Свръхдоминантен (АВ/ВВ+АА) Адитивен (2.АА+АВ/ВВ).

Изследвани SNPs в гените за микро-РНК-и:

SNPs	Локализация	В гени за микро-РНК-и
rs7372209 (T>C)	chr3:37969217	микро-РНК-26a-1
rs2910164 (G>C)	chr5:160485411	микро-РНК-146a
rs2682818 (A>C)	chr12:80935757	микро-РНК-618
rs353293 (G>A)	chr5:149427663	микро-РНК-143/145
rs322931 (G>A)	chr1:199050726	микро-РНК-181b

Със статистически програмен пакет SPSS for Windows, v.21. е извършен анализ на данните, които се оказват с потенциално значение по отношение на диагностицирането и прогнозата на КРК.

Резултатите от изследванията са описани подробно и точно и са онагледени с таблици и фигури, следвайки поставените задачи. На базата на получените достоверни и репрезентативни данни е развита задълбочена дискусия и са формулирани съответните изводи:

1. При сравняване на здрави индивиди от българската и други европейски кохорти е установено сходно честотно разпределение на изследваните полиморфизми.
2. Хетерозиготните индивиди с rs2910164 - miRNA-146a се характеризират с нисък риск от развитие на заболяването в свръхдоминантния генетичен модел.
3. Полиморфизмът rs2682818 - miR-618 също се проявява като протективен по отношение на КРК и в двата хетерозиготни генетични модела - кодоминантен и свръхдоминантен.
4. Носителите на доминантния А алел в хомозиготно състояние с rs353293 - miRNA-143/145 се характеризират с висок риск от развитие на КРК.
5. Носителите на генотип ТТ с rs7372209 имат значително по-дълга средна обща преживяемост (OS) в сравнение с пациентите, носители на ТС и СС генотипове.
6. Хомозиготните по А алела (AA) на rs353293 - miRNA-143/145 пациенти имат също по-дълга средна обща преживяемост (OS) спрямо пациентите носители на G алела.
7. ТТ rs7372209 генотипът е оценен като рисков фактор за развитие на КРК в десен колон.
8. Изследванията на нивата на miRNA-26a-1, miRNA-146a, miRNA-618 и miRNA-181b в плазмата имат диагностично значение, защото разграничават пациенти с метастатичен КРК от здрави контроли.
9. Изследваният за първи път при пациенти с КРК rs322931-miR-181b полиморфизъм не се асоциира с риска и прогнозата на заболяването.
10. Нивата в плазмата на изследваните шест миРНК-и при пациенти с метастатичен КРК не се повлияват от носителството на определен генотип при нито един от включените в изследването полиморфизми.

Представеното заключение е логично и обосновава изводите от дисертационния труд. В хода на проучването са сравнени алелите и честотите и генотипното разпределение на пет подбрани SNPs (rs7372209, rs2910164, rs2682818, rs353293 и rs322931) в гените за миРНК-ите сред българска група здрави индивиди с европейски здрави кохорти. Анализът показва сходно честотно разпределение на изследваните полиморфизми в двете групи. Установена е асоциация с риска от развитие на КРК за три от изследваните полиморфизми в българската кохорта пациенти с метастатичен

КРК (rs2910164 в гена за miRNA-146a, rs2682818 в гена за miR-618 и rs353293 в промоторния район на генния клъстер за miRNA-143 и miRNA-145). За два от изследваните полиморфизми е установена статистически значима асоциация с общата преживяемост на пациентите (генотип ТТ за полиморфизма rs7372209-miR-26a-1 и генотип АА за rs353293 в промоторния район на генния клъстер за miRNA-143 и miRNA-145).

В хода на изследването е оценено и нивото в плазмата, при пациенти и здрави контроли, на миРНК-ите в чийто гени са локализираните изследваните в проучването полиморфизми. Четири от тях показват различна експресия между здравите контроли и селектираните болни с висока специфичност и чувствителност - miRNA-26a-1, miR-146a, miRNA-618 и miRNA-181b.

Настоящото изследване е първото в България, което проучва и доказва асоциация на единични нуклеотидни полиморфизми в гените за некодиращи РНК-и като потенциални биомаркери, които биха могли предскажат риск от развитие на болестта и имат потенциална връзка с прогнозата на КРК.

Приносите на дисертационния труд са значими, с теоретично и приложно значение:

1. За първи път в България са получени данни за алелната честота и генотипното разпределение на полиморфизми в гените за некодиращи miRNAs сред здрави индивиди.
2. За първи път в България са получени данни за ролята на rs2910164-miR-146a, rs2682818-miR-618 и rs353293-miR-143/miR-145 като потенциални диагностични биомаркери за КРК пациенти.
3. За първи път в България са получени данни за ролята на rs7372209-miR-26a-1 и rs353293-miR-143/miR-145 като потенциални биомаркери с прогностично значение за КРК пациенти.
4. За първи път при пациенти с КРК е изследван rs322931-miR-181b.
5. За първи път са получени данни, потвърждаващи, че А rs353293 алела в хомозиготно състояние е рисков фактор за КРК и в кавказка кохорта.
6. За първи път са получени данни, потвърждаващи, че АС rs2682818 генотипа е свързан с нисък риск от развитие на КРК и в кавказка кохорта.
7. За първи път се докладва асоциация на ТТ rs7372209 генотипа с по-дълга средна OS при пациенти с метастатичен КРК.
8. За първи път се докладва асоциация на АА rs353293 генотипа с по-дълга средна OS при пациенти с метастатичен КРК.
9. Потвърдено е значението на rs2910164-miRNA-146a, като полиморфизъм, свързан с риск от развитие КРК.
10. За първи път са изследвани нивата на експресия miR-26a-1, miR-618, miR-181b във връзка с наличие на определен полиморфизъм (rs7372209, rs2682818 и rs322931, съответно).

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработеният от д-р Ростислав Радославов Манев дисертационен труд „ЕДИНИЧНИ НУКЛЕОТИДНИ ПОЛИМОРФИЗМИ В ГЕНИТЕ ЗА НЕКОДИРАЩИ РНК-И КАТО ДИАГНОСТИЧНИ И ПРОГНОСТИЧНИ МАРКЕРИ ПРИ БОЛНИ С КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ В МЕТАСТАТИЧЕН СТАДИЙ” покрива и надминава всички наукометрични изисквания на ЗРАСРБ и Правилника за РАС на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“- Варна за придобиване на ОНС „Доктор“. Това, както и представената научна продукция са основание, убедено да дам своята

положителна оценка и да препоръчам на членовете на почитаемото научно жури да присъди ОНС „Доктор” на д-р Ростислав Радославов Манев.

4.5.2022 г.
Варна

Изготвил становището:
Проф.д-р П.Троянова, дм

