

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ВАРНА
„Проф. д-р Параскев Стоянов“

Ул. „Марин Дринов“ 55, Варна 9002, България
Тел.: 052/ 65 00 57, Факс: 052/ 65 00 19
e-mail: uni@mu-varna.bg, www.mu-varna.bg



MEDICAL UNIVERSITY - VARNA
"Prof. Dr. Paraskev Stoyanov"

55, Marin Drinov Str., 9002 Varna, Bulgaria
Tel.: +359 52/ 65 00 57, Fax: + 359 52/ 65 00 19
e-mail: uni@mu-varna.bg, www.mu-varna.bg

РЕЦЕНЗИЯ

от

**ПРОФ. Д-Р ЛЮДМИЛА БОНЧЕВА АНГЕЛОВА, ДМ,
РЪКОВОДИТЕЛ КАТЕДРА „МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА“**

Специалност/научна степен– Професор по медицинска генетика, доктор по медицина
Институция– МУ „Параскев Стоянов“ Варна

Адрес и контакт: бул. „Христо Смирненски“ №1, УМБАЛ „Св.Марина“, Електронен
адрес: liudmila.angelova@mu-varna.bg, тел. 0898684701, сл. Тел. 052/978225

ОТНОСНО:

Дисертационен труд на тема *„ЦИТОГЕНЕТИЧНИ И МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С МНОЖЕСТВЕН МИЕЛОМ – ПРОГНОСТИЧНО ЗНАЧЕНИЕ“*

Автор: д-р **Валентина Димитрова Митева, докторант**

Форма на обучение - редовна форма, Катедра „Медицинска генетика“ МУ Варна, зачислена по докторантска програма „Генетика“ за придобиване на ОНС „Доктор“, Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление: 4.3. Биологически науки.

Научни ръководители: Проф. д-р Илина Димитрова Мичева, д.м.
Доц. д-р Трифон Георгиев Червенков, д.б.

Процедура по защита:

Съгласно Заповед № Р-109- 347/ 18.07.2023 г. на Ректора на МУ – Варна съм избрана за член на Научното жури, а на основание Протокол №1/27.07.2023 г.от първото (он-лайн) заседание съм определена за председател на Научното жури и рецензент на дисертационния труд на д-р **Валентина Димитрова Митева** за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ по научна специалност „Генетика“.

Д-р Митева е зачислена като редовен докторант по „Генетика“ със срок на обучение от 3 години (Заповед № Р-109-429 / 16.07.2018 на Ректора на МУ-Варна) при първоначална тема „Предиктивни генетични биомаркери при някои видове Неходжкинови лимфоми“, и научен ръководител проф.д-р Л.Ангелова. Съобразно решение на Катедрен съвет (Протокол №19/11.12.2020) по повод Доклад от Ръководител Катедра по Медицинска генетика (Проф.д-р Л.Ангелова, дм) темата се модифицира на „Цитогенетични и молекулярно-цитогенетични маркери при пациенти с множествен миелом –

прогностично значение“ с научни ръководители доц.д-р Трифон Георгиев Червенков, дб и доц.д-р Илина Димитрова Мичева, дм (Заповед №Р-109-23/15.01.2021 на Ректора на МУ Варна).

Етапите на докторантурата за допускане до защитата са спазени - решение на ФС (Доклад №103-3473 /13.07.2023 от Декан на Факултет Медицина разрешава възможност за удължаване на редовния срок с 6 месеца и прекъсване обучението за срок от 1 година по лични причини на докторанта. Докторантът е отчислен с право на защита (Заповед № Р-109- 347/ 18.07.2023 г.на Ректора на МУ – Варна).

Дисертационният труд на д-р Валентина Митева е изработен в Катедра по Медицинска генетика на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна; Лаборатория по медицинска генетика и Клиника по клинична хематология към УМБАЛ „Св.Марина“ЕАД Варна. По процедурата за защитата д-р Митева е представила всички необходими материали съгласно изискванията на ПРАС на МУ–Варна.

Настоящата рецензия е разработена и представена съобразно изискванията на Закона за развитие на академичния състав на Република България /ЗРАСРБ/, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав в Медицински университет /МУ/ - Варна. Декларирам, че нямам конфликт на интереси с автора на дисертационния труд.

Кратки биографични данни и професионална квалификация

Д-р Валентина Димитрова Митева е родена на 23.04.1984г. в град Балчик. Завършва средното си образование в СОУ „Стефан Караджа“, природо-математически профил, в гр. Каварна (Диплома № 585-55/2003), а висшето си образование по медицина в Медицински университет „Проф.д-р Параскев Стоянов“ Варна, (Диплома № 001457/2011). През същата година започва работа като лекар (по заместване) в Лаборатория по медицинска и молекулярна генетика на УМБАЛ „Св.Марина“ за 4 месеца до март 2012; продължава като лекар-ординатор в Неврологично отделение на „МБАЛ-Каварна“ ЕООД за 9 месеца през 2016 г.

Академичното си развитие д-р Митева започва през октомври 2016, когато след конкурс е назначена за редовен асистент към Катедра „Медицинска генетика“ на МУ-Варна (до октомври 2021) и за лекар-специализант към Лаборатория по медицинска генетика при УМБАЛ“Св.Марина“ Варна (до юли 2022 г).

Придобива специалност по Медицинска генетика (Диплома №025289 /01.01.2022г). Изгражда професионални умения и компетенции адекватни за изпълнение на преподавателска дейност по медицинска генетика на студенти „Медицина“, българо- и англо-езиково обучение и на студенти от ФОЗ „Акушерка“. Прави впечатление широкият спектър от интереси на д-р Митева като участия в квалификационни курсове и специализации, както и в 3 научни проекта финансирани от Фонд „Наука“ МУ Варна по проблемите инфертилитета и неизяснени генетични болести при деца. Тя е съавтор на 19 пълнотекстови публикации (10 от които в списания, индексирани в Web of Science / Scopus) и на 29 публикации в резюме (15 от които в индексирани списания).

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 123 страници и е онагледен с 39 фигури и 12 таблици. Включено е и едно Приложение. Ползваните заемки от цветни фигури и фотоси са с цитирана принадлежност на съответен автор.

Дисертацията включва: съдържание (3 стр.), съкращения (4 стр!), въведение (2 стр.), литературен обзор (45стр.), работна хипотеза (липсва), цел и задачи (2 стр.), клиничен контингент и методи (16стр.), резултати от проучването (21 стр.), обсъждане (5 стр) изводи (1 стр.), приноси (1стр.), библиография (24 стр.), публикации свързани с дисертационния труд (1 стр.). Библиографията обхваща 206 литературни източника, от които 4 на кирилица, като повечето са от последните 10 години.

Авторефератът, 69 стандартни страници, е написан в съответствие с дисертационния труд.

Забележка: Научният труд е структуриран в 8-те стандартни раздели, в приемливо съотношение при доминиращ обем на литературния обзор.

Актуалност на тематиката на дисертационния труд

Предоставеният за рецензия дисертационен труд засяга актуална тема свързана с необходимостта от подобро прогностично значение и осъвременяване подхода за лечение на Множествения миелом (ММ). Касае се за инвалидизиращо заболяване с висока честота в развитите страни и сложен геномен фенотип на миеломните клетки. Разбирането на поведението на тези клетки, на тяхната биология, са фактори с прогностично значение и са от изключителна важност за диференцирането на рискови групи и за оптимизиране на прилаганата терапия.

Литературния обзор впечатлява с обема си, онагледен с 20 фигури и 9 таблици. В него авторът правилно систематизира научната информация по разработваната тема, на места, с излишни пропеедвични детайли. Систематизирани са научните данни и се показва добра информираност по отношение на 1) Исторически и съвременен преглед върху биологията на Миеломна болест и 2) Клинични и лабораторни характеристики и стадий, класически и нови прогностични биомаркери.

Подкрепя се тезата, че в подпомагането на диагнозата и провеждането на терапия от основно значение са и генетичните изследвания, като най-често се използва конвенционалната цитогенетика (ЦГ) и флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH). Изяснява се, че в ранните етапи на ММ, кариотипът в повечето случаи е нормален, а поради ниската митотична активност на миеломните клетки криптични аберации остават „скрити“. В късните стадии на заболяването ЦГ може да идентифицира между 30-50% от хромозомните аномалии. Поради тази причина предлаганото отчитане на молекулярно-цитогенетичния профил чрез FISH (определящ протичането на заболяването) има за цел адаптиране към (Ревизираната) Международна стадираща система за разкриване на високо-рискови пациенти с ММ.

Представена е богата научна библиография, която показва доброто познание на докторанта за значими приноси от световно признати водещи хематолози в чужбина. Има дефицит на разработки от български автори в нучното и приложно поле на множествения миелом.

Забележка Липсва Обобщение на обзора, от което да бъде логично изградена и Работна хипотеза даваща основателни аргументи за избора на разработваната тема.

Целта на настоящия дисертационен труд е формулирана ясно - да се установи и анализира вида, честотата и прогностичното значение на хромозомните нарушения при новодиагностицирани пациенти с клинична диагноза множествен миелом. За постигането на тази цел са формулирани **7 задачи**, които са логически свързани и в синтезиран вид.

1. Да се *селектира обекта* на проучването, да се групира по стадии
2. Да се установи *честотата и структурата (вида)* на откритите хромозомните аберации
3. Да се анализират хромозомните аберации разкрити чрез *конвенционален цитогенетичен* метод и тяхното прогностично значение.
4. Да се анализират хромозомните аберации разкрити чрез *молекулярно-цитогенетичен* метод FISH и тяхното прогностично значение.
5. Да се направи анализ на *количеството плазматични клетки* в костен мозък спрямо цитогенетичните резултати.
6. Да се установи *преживяемостта* спрямо *цитогенетичните* резултати.
7. Да се направи сравнителен анализ на кривите на *преживяемост* в зависимост от стадиращата система.

Особен акцент отдавам на трета, четвърта и до шеста задача, свързани с възможността да се изведе корелация на клетъчно и субклетъчно ниво за генетични биомаркери с прогноза и преживяемостта на пациенти с ММ. От изясняваща редакция се нуждаят шеста и седма задача.

Материал и методи - разделът е представен в достатъчен обем. В проучването са включени събираните проспективно и ретроспективно данни за **110** новодиагностицирани пациенти с множествен миелом на възраст от 38 до 91 г. Пациентският контингент е насочван от университетската клиника по хематология на УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна за генетичен анализ в Лаборатория по Медицинска генетика на УМБАЛ „Св.Марина“ ЕАС Варна. Използвана е и информация от болничната електронна база данни.

Периодът на проучването е 5 години (2016-2020г), сравнително кратък срок за обхващане, като се има предвид рядкостта на заболяването. Пациентите са диагностицирани съгласно общоприети диагностични и риск стратифициращи критерии на Международната работна група по миелом; основен критерий за включване в проучването е пациентите да са с проведен конвенционален цитогенетичен и/ или молекулярно-цитогенетичен анализ чрез FISH.

Генетичните методи, усвоени и прилагани от докторанта са описани пропедевтично подробно и прецизно в лабораторни протоколи, така че биха могли да бъдат възпроизведени като основни техники за работа. Използван е статистически панел с богат набор от статистически методи с конкретно поставени групи въпроси и софтуерни продукти, лично дело на докторанта.

Забележка Изключващите критерии търпят прецизиране - според изследователските методи пациентите са разпределени в 2 основни групи генетични изследвания, които не са обработени с едни и същи методи

Резултатите са представени в отговор на поставените задачи и са онагледени с 3 таблици, 10 фигури и 1 Приложение, представлящо извадка от демонстративни кариограми и FISH сигнали при пациенти с патологични резултати. Приложените таблици и фигури са без дублиране на информацията. Според вида на поставените въпроси за разрешаване и проведените проучвания, резултатите са групирани в 3 групи и онагледени в Описание на пациентите по демографски показатели (възраст, пол) и стадираща система.

- Резултати от провеждане на конвенционален цитогенетичен анализ при 97 пациенти
- Резултати от прилагане на молекулярно-цитогенетично изследване (чрез флуорисцентна ин ситу хибридизация) при 30 пациенти
- Оценка на хромозомната находка и стадий към *средната* преживяемост на пациентит

Цитогенетичното изследване за прогностично значими хромозомни аберации за 5 годишен период е проведено при 97 пациенти, успешно при 83 (86%) от тях (*много добра методична успеваемост за добив и анализ на костно-мозъчни култури при пациенти с ММ*). Смятам таблица 11 тук за ненужна (нормална хромозомна находка на всички изследвани) и неточно озаглавена (колона с резултати от частично приложен FISH).

Интерфазен FISH анализ е проведен еднократно, със селектирани сонди при разнородна група от 30 пациенти, в т.ч. 17 обхванати от двата анализа. Така авторът, обяснимо е попаднал в капана на малките по брой пациентски групи, което ограничава възможностите за сравнимост на статистическите методи. Молекулярна цитогенетика с различни сонди за онкохематологични маркери е приложен практически при :

- 9 пациента – за търсене на del(17)(p13): открита в 6 лица (67%)
- 15 пациенти - търсене на del(17)(p13), транслокация t(4;14) и транслокация t(14;16): открита del(17)(p13) в 3 (20%); транслокации не са установени
- 6 пациента - търсене на преустройство в IGH гена (rear 14q32): неустановено.

Сред изследваните пациенти най-представена е del(17)(p13) наблюдавана в 67% (6/9)- хромозомният маркер, чието присъствие се асоциира с неблагоприятна прогноза. Намирам за удачно тези случаи да бъдат описани в таблица с разкрити хромозомни нарушения, съпоставяща двете генетични изследвания (по използвана сонда/и del (17)(p13); t(4;14), t(14;16); rear14q32). Така би се очертал паралелът мутационен статус - разкриваемост. Висока научна стойност би имала възможността за прилагане на по-разширен набор молекулярно-генетични маркери въвличащи IGH гена t(6;14), t(11;14), t(14;20) или набор, свързан с критериите за стратификация по Mayo за определяне на стандартен и висок риск при по-широк обхват на пациенти с ММ (посочени в таблица 7 на Литературен обзор). Вероятно това е въпрос и на финансиране за научни цели при бъдещи разработки. За цитогенетично неуловени преустройства в 14q32 региона (IGH гена), въведен и приложим е методично деликатен, но високо-чувствителен молекулярно-генетичен ДНК анализ чрез обратна транскриптаза на селектирани клетъчни популации - плазмощити.

Внимание привлича оценката, която прави докторантът на *статистически значима разлика* при съпоставяне на *средната* преживяемост на пациентите с: а) резултата от цитогенетичното и молекулярно-цитогенетично изследване; б) ISS стадия на заболяването, където и смъртността по клиничен стадий е значима. Наблюдава се липса на статистически значима разлика между средната преживяемост и резвизираната международна стадираща система R-ISS. Извеждане на констатациите е от сравняване на кривите на Kaplan–Meier или регресионен анализ.

Приемам посочените резултати и тяхната статистическа обработка, като адекватни на поставените цел и задачи.

Забележка - характеризирането на пациентите по пол и възраст е тяхна базисна характеристика и трябва да бъдат в раздела „Материал (пациенти) и методи“, а не в раздел Резултати.

Дискусията е основен раздел за всеки дисертационен труд, в който докторантът анализира получените резултати в контекста на познанията си от литературния обзор и търси логичен анализ в оценка и съпоставимост.

В сходни по обем популационни проучвания се откриват сходни данни за средна пвъзраст на заболяемост (62г) и възраст за пик на заболяемост 65-69 години (25,45%).

Потърсена е обща честота на хромозомни нарушения при болни с ММ с множество проучвания с близък брой обхванати пациенти, където границите на патологията се движат в интервал 31,1% до 66%, на фона на разкритата в конкретното проучване от 20% което се нуждае от обсъждане на методичния подход за съпоставка.

Докторантът надгражда хромозомните маркери и умело се насочва към молекулярно-цитогенетично ниво, което има стойност на прогностичен и предиктивен маркер за по-прецизна оценка на риска от прогресия. Авторът се опитват да оцени находките спрямо клиничния стадий макар и в малка група от пациенти, като излиза извън рамките на генетичното лабораторно познание и търси интердисциплинарен подход към хематологично засегнати пациенти, неизползван в масовата клинична практика.

Удачно е да се коментират и получени находки като делеция в 8q24 както и 45,XY, -Y. Най-честите монозомии са по хромозоми 13,14,16 и 22, но при някои от пациентите се установява загуба на X или Y хромозома¹⁸⁹.

Забележка Кратко застъпен раздел, с елементи на литературен обзор и непълнота в анализ.

Изводите на научния труд са базирани на получените данни и отговарят на поставените цел и задачи.

1. Приложеният сравнителен анализ на честотата и структурата на хромозомните нарушения при новодиагностицирани пациенти с ММ показва голямо съответствие на данните от нашето проучване с тези описани в литературата.
2. Честотата на откритите хромозомни аберации установени чрез конвенционална ЦГ е 17% (n=14), като те са разделени на хипердиплоидни и нехипердиплоидни. Честотата за открита патология чрез FISH анализ е 30% (n=9).
3. Оценката на откритите хромозомни нарушения чрез ЦГ:
 - При пациентите с хипердиплоиден кариотип преобладават тризомиите
 - При пациентите с нехипердиплоиден кариотип преобладават структурните нарушения
4. Оценката на откритите хромозомни нарушения чрез FISH анализ Чрез FISH анализ при 9 пациента (30%) е открита делеция в 17 хромозома – del(17)(p13), при останалите резултата в бил нормален.

5. Установена е зависимост между количеството плазматични клетки в аспирационна биопсия на КМ и патологичните кариотипи:
 - При всички пациенти (n=14) с патологичен кариотип броя плазматични клетки е надхвърлял 30%.
 - При пациентите с нормален кариотип при 51% (n=35) процента плазматични клетки в КМ е надхвърлял 30%, при 32 (46%) е бил по-малко от 30%, а при двама (3%) стерналната пункция е била суха.
6. Установява се статистически значима разлика по отношение на средната преживяемост спрямо цитогенетичната находка, при пациентите с нормален кариотип тя е 34 месеца, а при тези с патологичен – 8 месеца (p=0, 0493).
 - Не се установява статистически значима разлика в средната преживяемост между пациентите с хипердиплоиден и нехипердиплоиден кариотип вероятно поради малкия брой пациенти (p=0, 63). Същото се отнася и за откритите хромозомни нарушения по ISS стадий (p=0,094).
7. Статистически значима разлика се установява в преживяемостта спрямо ISS стадия (p<0, 05) Данните от анализа показват средна преживяемост от 11 месеца при пациентите в трети стадий. При тези във втори стадий тя е средно 60 месеца, а в първи – 67 месеца.
 - Не се откри статистически значима разлика в преживяемостта спрямо R-ISS стадия (p=0, 14). Средната преживяемост на пациентите във втори стадии по R-ISS е 41 месеца, а в трети – 18 месеца.

Забележка. Начинът за представяне на болинството изводи е приемлив. Някои от изводите се нуждаят от пояснение за да не звучат като констатации (1) или обяснения (6), други от редактиране (3,4) за да отговорят на задачата за прогностичното им значение.

Приемам авторската самооценка за **приносите** на дисертационния труд, оформени в 2 групи, без приноси с оригинален характер.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е значението на системите за класификация и рисковата стратификация като прогностични фактори
2. Потвърдено е значението от приложението на конвенционален цитогенетичен метод и FISH анализ като рутинни методи с цел разграничаване на ниско и високо рискови пациенти с ММ
3. Потвърдено е значението на хромозомните нарушения като прогностичен фактор за преживяемостта в българската популация

Приноси с приложен характер

1. При всички новодиагностицирани пациент с ММ се препоръчва провеждане на ЦГ и FISH, които са от изключително значение при избора на терапевтична схема, а също и за прогнозата.
2. Насочването за изследване на t(4;14) и del(17p), които са с неблагоприятна прогноза при новодиагностицирани пациенти с ММ, се препоръчва като задължителен елемент от диагностичния панел изследвания.
3. Препоръчително е анализа за t(4;14) и del(17p13) да се провежда чрез FISH.

По приносите с приложен характер намирам неточност (1) касаеща избора на терапевтична схема (необвързвана корелация) и неимотивираност (3) за прилагане на FISH за търсене на t(4;14) в резултат от настоящия труд.

Трудове във връзка с дисертацията

По научната си разработка д-р Митева е представила: **5** публикации в *тълен текст* (в съавторство): 3 в реферирани списания *Archives of Hellenic medicine* (2023), *Cytology and Genetics* (2023), *Обща медицина* (2019) и 2 в сп. *Медицински преглед* (2022) (2021); както и **2** публикувани съобщения от участия в научни форуми: *Abstract Book HemaSphere* (2021) и *European Journal of Human Genetics* (2020). Прави добро впечатление, че

докторантът е първи или втори автор в тях; публикациите в *Archives of Hellenic medicine, Cytology and Genetic* и резюмето в *European Journal of Human Genetics* са реферирани списания с импакт фактор. Почти всички са от периода на последните три години (2021-2023) след обхванатия период, което обяснява до известна степен и процедурното забавяне по защитата на дисертационния труд.

Критични бележки, коментар и препоръки към дисертационния труд:

Отделните бележки и коментари съм представила по раздели.

Обобщеното ми виждане върху научната разработка е, че по същество тя представя придобит лабораторен (лично умение и изработване) и анализаторски опит за молекулярно-цитогенетично изследване на пациенти с миеломна болест в помощ на клиничната онкохематологична практика. Съгласна съм напълно със становището на д-р Митева за ограничения в проучването, произтичащи от малкия брой пациенти с приложен FISH анализ за кратък период на обхващане (5 години). Известна ми е финансовата тежест на изследванията в областта на молекулното ниво в медицината (генетика) и разбирам рестрикциите, произтичащи от този фактор. Насърчавам докторанта да продължи придобития опит чрез разширени кохортни проучвания и с други генетични анализи при пациенти с ММ за по-дълъг период от време за да задълбочи научната дискусия за целите на клиничното приложение.

Някои структурни и технически препоръки, за съображение в бъдещи научни разработки (роля и на научните ръководители) са свързани с представяне на Научна хипотеза и Обобщение на литературния обзор; научно прецизиране на цитогенетични маркери и FISH сигнали съобразно приетата номенклатура.

В личен план - познавам докторантката д-р Митева от постъпването ѝ в Катедрата през 2016 до 2022. Като асистент и специалист, тя притежава много добри теоретични и практически познания в областта на медицинската генетика, които ежедневно прилагаше в практиката си като лекар и преподавател. Та е колаборативен и толерантен колега с умения за работа в екип и с технически умения (сертифицирани компетенции) за работа с компютърни програми и платформи.

Заключение:

Дисертационният труд демонстрира добри познания на докторанта в областта на биологичните, генетични науки (теоретични и лабораторни) и умения за ползване на статистическа методи и бази данни при обработка за тяхното клинично приложение на актуална тема. Докторантът покрива наукометричните критерии съобразно правилника за академично развитие на МУ-Варна за присъждане на научно-образователна степен „Доктор“. Препоръчам на научното жури да присъди научно-образователна степен „доктор“ по научна специалност „Генетика“ на д-р **Валентина Димитрова Митева**.

25.08. 2023 Председател на НЖ (рецензент):

ПРОФ. Д-Р ЛЮДМИЛА АНГЕЛОВА, ДМ