

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на тема *“Генетични характеристики и прогностични маркери при белодробен карцином”*, представен за публична защита пред научно жури за присъждане на образователната и научна степен **“Доктор”** в професионално направление „Биологични науки” ,научна специалност „Генетика”

**Автор на дисертационния труд:** *Мохаммад Жабер Мухауши*

**Научни ръководители:** проф. Севдалин Георгиев, дбн и проф. Драга Тончева, дбн

**Рецензент:** професор д-р Стоян Ганчев Лалчев, дм , Катедрата по медицинска генетика, Медицински Университет- София

### **Актуалност на проблема:**

Дисертационният труд е посветен на проучване на молекулно-генетичната характеристика на широко разпространено злокачествено заболяване - белодробния карцином с най-нови геномни технологии. Генетичните аспекти на недробноклетъчния белодробен карцином са изследвани при предишни проучвания на двама докторанти у нас, които проведоха експресионни анализи на гени, регулиращи определени процеси в туморогенезата. Независимо от усилията на наши и чужди изследователи, все още не са достатъчно задълбочено опознати генетичните и епигенетични промени, които съпътстват патогенезата и прогресията на белодробния карцином. Характеризирането на геномни аберации, характерни за белодробната канцерогенеза би улеснило въвеждането на бързи и ефективни методи за диагноза и прогноза.

При съвременното развитие на микрочиповите технологии, пред изследователите се откриха нови възможности за изучаване на това тежко и често фатално завършващо заболяване.

**Структура и оформление:** дисертацията е оформена на английски език с общ обем 204 страници, разпределени в четири глави. Първата от тях представлява литературен обзор, 45 страници. Останалите три глави в обем съответно 50, 54 и

30 страници са посветени на собствените проучвания, като всяка от тях има стандартно съдържание с включени подраздели: материал и методи, резултати, дискусия и заключение. Това изложение е взимствано от европейската структура на дисертационните трудове и позволява логично представяне и анализиране на постигнатите резултати. В началото е описано съдържанието и използваните съкращения на 2 страници. Анализирани проблеми, както и резултатите от собствените проучвания са много добре онагледени с 38 таблици и 51 фигури.

**Литературен обзор:** обхваща 45 страници и включва 197 литературни източника на латиница, голямата част от които са от последните 5-10 години. Той е съвременен по съдържание, компетентно и целенасочено визиран към проучвания проблем. Условно обзорът може да се раздели на две части – *обща* и *специална*. Общата част е посветена на хистологичната класификация и стадиране на белодробния карцином; диагностичните подходи, рискови фактори и прогресия на заболяването; генетични аспекти на канцерогенезата. Разгледани са ролята на хромозомните аберации за развитието на рака на белия дроб; молекулните аномалии разкрити при големи мета-анализи; представена е хипотеза за молекулната патогенеза на заболяването;. Дисертантът подробно описва ролята на загубата на хетерозиготност за злокачествената трансформация на клетките и значението на процеса на ДНК метилиране при белодробния рак. Представени са и нови кандидат гени, асоциирани с болестта.

Втората част представлява задълбочено и критично проучване върху стратегиите за разкриване на молекулни аберации при човешки тумори. Направен е обстоен обзор на методичната литература, свързана с генетични изследвания чрез използването на геномни микрочипови технологии, базирани на сравнителна геномна хибридизация (CGH микрочипове) и на анализ на единични нуклеотидни замени (SNPs микрочипове), както и възможности за тяхното приложение в клиничната практика.

От литературния обзор става ясно, че белодробният карцином не е добре проучен в молекулярно-генетично отношение. Последното прави практически невъзможно прилагането на един диагностичен метод и обосновава търсенето на комплекс от подходи, които в комбинация биха улеснили и подобрили характеризиранието на специфичен молекулен спектър на отделните

белодробни тумори. Така, проучвайки методичната литература, докторантът се насочва към комплексно прилагане на нови изследователски подходи за разкриване на неописани геномни нарушения при рака на белия дроб.

**Цел и задачи на дисертацията:** Целта на дисертацията е формулирана кратко и ясно: *„Да се характеризират цялостните геномни нарушения при белодробния карцином чрез използване на нови микрочипови технологии”*. За постигане на поставената цел логично са формулирани шест конкретни задачи, включващи изследвания със три различни типа микрочипове – CGH, SNPs и метилационни, анализиране на молекулните профили, определяне на специфични нарушения и финно картиране на най-значимите от тях.

**Материали и методи:** В проучването са използвани 32 туморни проби от пациенти с недребноклетъчен белодробен карцином от тъканната банка на Катедрата по медицинска генетика. Същите са постоперативно стадирани съгласно критериите на UICC. Използвани са съвременни молекулярно генетични техники за екстракция и оценка на ДНК и молекулярен профил на туморите с три микрочипови платформи: сравнителна геномна хибридизация (CGH) върху BAC микрочипове, SNP микрочипове (HumanCytoSNP-12, Illumina Bead Chip) и ДНК метилационни микрочипове и съответни софтуерни програми. Използваните методи са детайлно описани и подходящо онагледени.

**Резултати и обсъждане:** В глава втора на дисертационния труд са представени данните от изследването на 10 туморни проби от недребноклетъчен белодробен карцином с CGH микрочипова техника. Доказано е, че повишен брой копия на тумор (гейн и амплификация) се среща със средна честота 4.3/тумор, а загуба на генетичен материал - 5.8/тумор. Отчетени са бройни аберации, обхващащи цели хромозоми: тризомия 1, тризомия 13, тризомия 18, тризомия 20, като монозомии не са наблюдавани. Установен е допълнителен материал в хромозомни рамене – 5p+, 7p+, 11q+, 14q+, 20q+ и Xq+ и загуби на хромозомни рамене – 1p-, 5q-, 10q- и 15q-. Отчетени са регионални аберации с допълнителен материал (гейнове и амплификации по-големи от 5 Mb) в 7p (район, съдържащ онкогена EGFR), 12p (онкоген KRAS) и със загуба (делеции) в 3p26 и 4q34. В районите с висока амплитуда на генетични допълнения са селектирани кандидат- онкогени – NBPF4; ETV1, AGR3, TSPAN13, SOX5, FGFR10P2, GPC6. В районите с висока амплитуда на генетични загуби са селектирани потенциални туморсупресорни гени – DPYD; CLDN22, CLDN24, ING2, CASP3.

SORBS2 и DEFB.

В глава трета на дисертационния труд са представени резултатите от 8 туморни проби анализирани със SNP микрочипове, с което се покрива цялостния геном за небалансирани генетични нарушения. Установени са различни типове геномни нарушения, засягащи всички хромозоми, свързани с инактивиране на гени за клетъчна пролиферация и хомеостаза и полиморфизми на единични нуклеотиди (SNPs), открити при 5 пациенти (T2, T3, T6, T7 и T8). Това е първото проведено изследване на туморни проби у нас с тази платформа, която позволява да се направи много по-прецизно молекулно кариотипиране на туморите и да се анализират нови находки - мозайки и загуба на хетерозиготност. Находките могат да очертаят таргетни позиции за идентифициране на онкогени и туморсупресорни гени, включени в патогенезата на заболяването.

Глава четвърта на дисертационния труд е посветена на епигенетични проблеми при рак на белия дроб и на връзката между ДНК метилационния профил и карциногенезата. За първи път при използване на метилационни микрочипове за изследване на белодробни карциноми при изследване на 14 проби са определени пет гена (ZNF569, MAOA, LAS1L, SIM1, DHP) с диференцирано метилиране при пациентите в сравнение с контролите. Специфичен метилационен профил е установен при туморите Grad 3, където са регистрирани 27 хиперметилирани гена и само един хипометилиран. Хиперметилирането е регистрирано предимно в промоторите (10 от случаите и 14 в структурата на гените).

Получените резултати от проучванията с трите микрочипови платформи са документирани прецизно, включително и с оригинални образи от микрочиповите анализи. Случаите с открити генетични изменения са обсъдени компетентно.

**Изводи:** В заключителната част на дисертационния труд, дисертантът прави кратко обобщение на постигнатите най-значими резултати и формулира основните изводи, които приемам, като съответстващи на представените резултати и тяхното значение. Оригиналната част от изследването е свързана с комплексното прилагане на три микрочипови платформи, базирани на CGH, SNPs и метилиране.

1. С CGH микрочиповете е определена средна честота на

генетичните копия (гейн и амплификация) - 4.3/тумор, а загуба на генетичен материал - 5.8/тумор и средна стойност на патологичните отклонения - 10.1/тумор.

2. При туморите в по-ранен стадий преобладават големите и регионалните аберации, докато в туморите с напреднал стадий водещи са микроструктурните аберации.
3. С CGH микрочиповия анализ са установени малки геномни аберации от тип гейн и амплификация по-често в хромозоми 7p и 12p, носещи съответно онкогените EGFR и KRAS и генетични загуби в 3p26 и 4q34.
4. На базата на CGH микрочиповия профил са установени нови потенциални онкогени – NBPF4, ETV1, AGR3, TSPAN13, SOX5, FGFR1OP2 и GPC6 и такива от туморсупресорната фамилия-DPYD; CLDN22, CLDN24, ING2, CASP3, SORBS2 и DEFB.
5. SNPs микрочиповете разкриват много по-богата цитогенетична находка, засягаща всички хромозоми с преобладаване на дубликациите. Загуба на хетерозиготност е установена при 5 пациенти. Тази микрочипова платформа единствено позволява анализиране на хромозомни находки като мозайки и загуба на хетерозиготност
6. Метилационните микрочипове са много подходящи за анализ на белодробни тумори, при които се очаква силно влияние на вредни фактори на околната среда. С този анализ е доказано диференцирано метилирани гени при пациентите ZNF569, MAOA, LAS1L, SIM1, DHP в сравнение с контролите.
7. Специфично метилиране е открито при пациенти с напреднал рак – 27 гена са хиперметилирани, спрямо 1 хипометилиран.

#### **Научни приноси:**

1. За първи път у нас е проведено изследване на молекулярния профил на недребноклетъчния белодробен карцином с прилагане на 3 различни микрочипови платформи- CGH, SNPs и метилиране.
2. Въз основа на резултатите от проведените комплексни изследвания, докторантът прави научен принос в молекулярното характеризирание на недребноклетъчния белодробен карцином, като определя нови за

заболяването кандидат онкогени, туморсупресорни гени и гени с променено промоторно метилиране.

**3.** Разкрива ролята на LOH в молекулните механизми на белодробния карцином.

**4.** Със SNPs микрочиповата платформа се разкрива преобладаващата роля на генетичните дупликации.

**5.** Резултатите ще бъдат от полза за бъдещи изследвания на белодробния карцином у нас, като използваните микрочипови изследвания биха намерили място, както при бъдещи проучвания, така и за идентифициране на маркери с потенциално прогностично и терапевтично значение.

**Автореферат:** Приемам така оформения автореферат, като отразяващ основните раздели на собствените разработки. Той е достатъчно информативен и може да се ползва, като източник за запознаване с резултатите от проучването и достоинства на дисертационния труд.

По дисертацията са направени 3 публикации в чужди списания и има 1 участие на международен конгрес.

**Забележки:** критичните ми бележки са свързани основно с някои технически пропуски, като: фиг. 11 от гл.3(стр. 120-121) липсва, вероятно пропуск при номерацията; някои таблици, като № 9 и № 11 от гл.4 са разбити на две страници, а биха могли да се представят цялостно за по-добро възприемане; таблици № 2, 3, 4, 5 и 6 от гл.4 биха могли да се изпуснат, като маломерни и слабо информативни (дават данни за инградиенти на реактивни смеси); има и някои правописни и стилови грешки при английското изложение. Тези пропуски не се отразяват на получените резултати и не намаляват достоинства на работата.

**Заключение:** считам, че актуалността и значимостта на темата, използвания най-съвременен изследователски подход за геномни изследвания с микрочипови платформи и получените данни с определен приносен характер дават основание да се приеме, че трудът отговаря на всички изисквания и препоръчвам на научното жури да присъди на *Мохаммад Жабер Мухауши* образователната и научна степен „доктор”.

01.07.2013 г.

Рецензент:

(Проф. д-р Ст. Лалчев, дм)