Р Е Ц Е Н З И Я

на дисертационния труд на тема ***"Рак на белия дроб – индивидуализиране на лекарственото лечение***, представен за публична защита пред научно жури за присъждане на научната и образователна степен "Доктор" по професионално направление 7.1."Медицина", научна специалност
" Онкология"- шифър 03.01.46

Автор на дисертационния труд: д-р Наталия Петева Чилингирова

Научни ръководители:проф. д-р Галина Куртева, дм; чл.кор. проф. д-р Драга Иванова Тончева, дм, дбн

Рецензент: професор д-р Стоян Ганчев Лалчев, дм

Биографични данни за докторантката

Д-р Наталия Чилингирова е придобила магистърска степен по медицина в МУ- София през 2011 г. От същата година работи като лекар в Клиниката по медицинска онкология на СБАЛО ЕАД София. В периода 2012-2015 г. е била на краткосрочно обучение в онкологични отделения на болници в Варшава, Виена и Базел. Още от студентските години проявява интерес към онкологията и е била на обучение в Клиниката по медицинска онкология на Университетската болница в Цюрих. Запознала се е с молекулярно генетичните методи в медицината в Тракийския Университет, Ст. Загора, и като доброволец е работила в Клиничния Онкологичен център в Ст. Загора и СБАЛО- София.

Владее немски и английски и ползва руски език. Като студентка е изнасяла доклади по проблеми на онкологията в научни конференции на студенти и млади лекари.

Актуалност на проблема

Ракът на белия дроб е сред водещите причини за смъртност сред онкологичните заболявания.Съвременната класификация на заболяването на базата на хистохимичния анализ и съвременни молекулярно- биологични техники, показват изключителна хетерогенност на тази нозологична единица. Това обуславя незадоволителния терапевтичен ефект и ниската преживяемост при прилаганите схеми за химиотерапия и таргетна терапия и налага търсене на нови терапевтични подходи за индивидуализирано лечение.

В постгеномната ера активно се търсят главните кандидат гени за това комплексно заболяване. Макар и в начална фаза тези изследвания дават обещаващи резултати за разбиране патогенезата и въвеждането на подходящи варианти 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.

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.

Структура и оформление на дисертационния труд

Дисертацията е оформена съгласно изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ и е с общ обем 167 страници, с добро пропорционално разпределение на основните раздели: литературен обзор - 55 страници, материал и методи – 23 страници, резултати и обсъждане – 66 страници, изводи и приноси – 2 страници. Библиографията включва 245 литературни източника, предимно на английски. Анализираните проблеми, както и резултатите от собствените проучвания са много добре онагледени с 48 таблици и 41 фигури.

Литературен обзор

Разработен е при използване на литературни източници от последните 10-15 години.Той е съвременен по съдържание, компетентно и целенасочено визиран към проучвания проблем.

Накратко са представени диагностичните подходи и прогностичните

критерии - клинични, морфологични, молекулярно-генетични, както и критериите за стадиране на заболяването. Съобразно стадия на заболяването е представен и терапевтичния алгоритъм за химио и таргетна терапия при двата основни вида рак на белия дроб- недребноклетъчен(НДРБД) и дребноклетъчен(ДРБД).

Основна част на литературния обзор основателно е посветена на данните от последното десетилетие отнасящи се до генетичните механизми за злокачествена трансформация. Докторантката много добре е очертала полигенната природа на рака и необходимостта от акумулиране на множество соматични мутации за стартиране на злокачествената трансформация, участието на основни групи гени - онкогени, туморсупресорни гени, ДНК репариращи гени, както и значението на епигенетичните промени в раковия геном. Акцентирано е върху ролята на т.нар. главни, водещи (driver) мутации водещи до клонална експанзия, за разлика от множеството открити в раковите клетки за сега неутрални (passenger) мутации. Раковият геномен анализ позволява молекулно субтипизиране съобразно първичните генетични дефекти и нарушенията в сигналните пътища. Подчертано е, че мутационния профил може да се различава значимо при пациенти с един и същ хистологичен вариант, като се идентифицират, както точкови мутации, така и делеции, инсерции амплификации и вътре- и междухромозомни пренареждания с формиране на фузионни гени. Молекулното типизиране на туморите е основа за предлагане на адекватни подходи за лечение и специфична, индивидуализирана таргетна терапия. Очертани са най-често мутиралите гени при недребноклетъчния тип-EGFR, K-RAS, ALK и различните молекулни подтипове на белодробния рак с висока степен на доказателственост и със средна и ниска такава. Мутациите в един и същ ген, но в различни позиции могат да обуславят различен отговор на таргетна терапия. Този факт сполучливо е анализиран със спектъра на мутациите в EGFR- делециите в екзон 19 са с добър отговор към ТКИ (erlotinib и gefitinib), а инсерции в екзон 20 предполагат резистетност на терапията. Подчертана е ролята на K-RAS мутациите, по-често срещани при аденокарциномите, като лош прогностичен фактор за преживяемост, независимо от терапията.

Съществен момент на терапията на злокачествените заболявания и в частност на белодробния карцином са нежеланите лекарствени реакции - хематологични и нехематологични при прилагане на химиотерапевтици и таргетните молекули. Те са професионално систематизирани по степен и вид в таблица, съгласно NCI-CTCAE/Common Terminology Criteria for Adverse Events/v.4.03/2010 г. За обяснение на индивидуалната поносимост и чувствителност към терапевтичните агенти докторантката накратко е представила информация от областта на фармакогенетиката и фармакогеномиката. Подчертава се значението на геномния анализ за откриването на генетични полиморфизми, които могат да повлияят експресията на гени свързани с лекарствения метаболизъм.Това би позволило да се оптимизира лекарствената терапия съобразно генотипа на пациента и да се осигури максимална ефективност на лечението при минимални странични ефекти, което е крачка в посока „персонализирана медицина".

Тъй като лечението на белодробния рак е комплексно и все още незадоволително с редица странични ефекти и при очертаващата се тенденция за разширяване на новите подходи за таргетна терапия, отношението на пациента към нея и сътрудничеството с лекуващия екип е важен фактор при избора на лечение. Тези въпроси паралелно се проучват в онкологията и докторантката с основание е анализирала факторите определящи крайното решение. Анализирани са данните от редица проучвания на този проблем и се подчертава, като важен фактор при избора осигуряване на качеството на живот.

Литературният обзор е центриран към планираните проучвания и като цяло показва много добро познаване на проблема, аналитично мислене и способност за обобщаване. Докторантката добре е очертала дискусионността и нерешените въпроси от разглежданата тематика.

Цел и задачи на дисертацията

Целта на дисертацията е да се оптимизира и индивидуализира ефективността на диагностиката и лечението при карцином на белия дроб чрез оценка на отношението на пациентите към лечението и изследване на генетични сигнатури на туморите. За постигане на поставената цел в двете направления на

разработката логично са формулирани съответно шест и пет конкретни задачи.

Материал и методи

Проучването се базира на представителна група български пациенти с рак на белия дроб на средна възраст 61,6 г. –общо 187 от двата пола (149 мъже и 38 жени).Пациентите са разпределени в подгрупи в зависимост от хистологичното типизиране, като преобладават тези с плоскоклетъчен карцином(36,4%), следвани от тези с дребноклетъчен(20,3%), аденокарцином(11,2%) и жлезистоклетъчен(9,1%). Повечето от тях са в 4-ти и 3-ти стадий на развитие. Предварителният генетичен анализ установява само един пациент с мутация в EGFR гена.От включените в проучването пациентите е събрана информация за експозиция на потенциално рискови фактори(тютюнопушене, употреба на алкохол), както и данни за съпътстващи заболявания и социалния им статус– образование, семейно положение с оглед на поставените задачи. Пациентите са подложени на стандартна химиотерапия или таргетна терапия съобразно утвърдените стандарти.

За оценка на отношението на пациентите към провежданата терапия и лекуващия екип е разработена подходяща анкетна карта, попълнена двукратно - преди лечението и след 2-4 терапевтични курса. За статистическа обработка на събраната информация са използвани подходящи методи – оценка на преживяемостта по Каплан-Майър, факторен анализ на базата на корелационна матрица, критерий на Мак-Немар за оценка на промяната в становищата на пациентите след проведената терапия.

При 20 от всички обследвани пациенти с НДРБД е проведено молекулярно типизиране чрез геномно секвениране.Използван е съвременен метод за паралелно екзонно секвениране(NGS) с TruSight Cancer MiSeq микрочипова платформа,Illumina. Панелът включва 94 гена, асоциращи с чести и редки онкологични заболявания, както и 284 полиморфни варианта(SNPs), доказани че корелират с рак от цялостногеномни асоциативни проучвания. Използвана е изолирана ДНК от парафинови блокчета от първичен тумор с верифицирана хистологична диагноза от патолог. Стъпките на процедурата са представени стегнато и компетентно. За сравнение на получените данни са използвани релевантни референтни

база данни - Human gene mutation database (HGMD), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) , PubMed.

Резултати и обсъждане

При проведения генетичен секвенционен анализ при използване на подходящ раков микрочипов панел с 94 гена и 284 полиморфни SNPs варианта в изследваната група пациенти с НДРБД в биопсичния материал са установени общо 243 генни варианта. Според хистологичния подтип най-многобройни са те при аденосквамозния карцином –22 на проба и при плоскоклетъчния карцином - средно 16 на проба. Тази данни потвърждават факта,че в раковите клетки с времето се натрупват множество генетични нарушения.

При сравнение с референтната бази данни генетичните нарушения са групирани в 3 групи : а). патологични (driver) мутации предразполагащи към рак; б). вероятно патологични мутации в. варианти с неясно за сега клинично значение.Установена е изключителна хетерогенност на регистрираните мутации по тип и като комбинации, явяващи се уникални за почти всеки изследван пациент.Във всички проби са установени генетични варианти, водещи до загуба на функция.

Мутациите от отделните 3 групи са обобщени за всеки хистологичен субтип и за всеки пациент.В подтипа плоскоклетъчния карцином са установени патологични мутации в 8 гена –TP53 (в 4 различни позиции), XPC, WT1, NF1 KIT, TSC1, MSH2 и GPC3; при аденосквамозниа карцином също в 8 гена – APC (в 3 различни позиции), TP53 (в 2 различни позиции), BRCA2, ATM, NF1, CDKN1C, PTEN и EZH2.; за пациентите с едроклетъчен карцином- TP53 (в 2 различни позиции), BRCA2 и MET; при аденокарцином - TP53 и FH; при невроендокринен карцином - TP53, BRCA1 и APC. Прегледът на идентифицираните патологични мутации показва, че при всички пациенти е засегнат тумор супресорния ген TP53, което е потвърждение на чужди изследвания показващи ангажираността му във висок процент при аденокарциномите. Освен цитираните патологични гени при всички изследвани пациенти в туморните проби са установени множество генни мутации от различен тип - мис-сенс, нон-сенс, които сравнителният анализ с RadialSVM и LR (logistic regression) класира като потенциално патологични. Те представляват определен интерес за бъдещи

проучвания.

Проведеният секвенционен анализ и получените данни разкриват изключителна хетерогенност на белодробния рак и макар и проведени върху малка група демонстрират необходимостта от молекулно субтипизиране. Данните обогатяват и познанията ни относно сложната патогенеза на белодробния рак, допълват данните за раковия геном и са с определен теоретичен и практично насочен принос.

Интересни данни са получени и от фармакогенетичното проучване. Проведеният генетичен анализ разкрива генетични полиморфизми с фармакогенетично значение, които могат да бъдат предиктивни фактори по отношение на терапията и нежеланите лекарствени реакции. Регистрирани са SNPs полиморфизми в 15 гена. Някои от тях в гените - TP53(rs1042522), ERCC2(rs1799793), ARID5B(rs10821936), XPC(rs2228001) EGFR(rs2227983) според референтните база данни в хомо или хетерозиготно състояние са свързани с вариации в отговора при лечение с различни цитостатици и таргетни молекули, каквито данни има в литературата. Полиморфизми установени в други гени (CDK4,HNF1A, MC1R, KIF6, SLCO3A1, CHRNA3, HRH1) са свързани с вариабилност в отговора към други медикаменти. За идентифицираните полиморфизми в гените FGFR2, AGPHD1 и ADH1, няма данни за фармакогенетичен ефект засега и са потенциални кандидати за бъдещо дирене.

Резултатите от проведените фармакогенетични проучвания, макар и получени върху малък брой изследвани лица имат определен научен принос, като отправна точка за бъдещи проучвания и практическо значение за терапевтичната практика.

Пряко свързано с терапията е и проведеното за първи път у нас анкетно проучване при 187 пациенти с рак на белия дроб, за да се оцени отношението им към терапията и лекуващия екип. За целта е изготвена анкетна карта с релеванти въпроси, попълнена преди и след провеждането на терапията. Въпросите включени в картата са определено свързани с проблеми на клиничната психология в онкологията и онкологичната консултация, като се отчита необходимостта от активна колаборация на пациентите в терапевтичния процес. С критерия на Мак-Немар за оценка на промяната в становищата е отчетено статистически значимо понижение на

позитивните отговори(бал-5) на въпросите А, В и С при второто попълване на картата – А1-73,7%/А2-59,9%; В1-60,2%/В2-30,8%; С1-66,1%/С2-52,2%. Това очевидно е свързано с проведената терапия. С приложения факторен анализ се установява, че към първоначалните два фактора определящи мотивацията на пациентите –„стремеж към здраве" и „избягване на страданието от болеста" се добавя трети-„избягване на страничните ефекти от терапията". Ясно е очертан стремежът на болните към запазване качеството на живот, което е зависимо от страничните ефекти на терапията. Тези обобщени данни допълват познанията на терапевтите и дават количествена оценка на нагласата на пациентите и са полезни в практически аспект.

Данните от проучванията в дисертационния труд са документирани с подходящи таблици и фигури. Резултатите са обсъдени компетентно и сравнени с известните литературни данни, като докторантката прави адекватни интерпретации и заключения, което е показател за добри умения за боравене с научните факти.

Изводи

В заключителната част на дисертационния труд, дисертантът прави кратко обобщение на постигнатите най-значими резултати и възможното им практическо приложение и формулира 8 основни изводи, които приемам, като съответстващи на представените резултати и тяхното значение.

Научни приноси

Дисертационният труд има редица оригинални и потвърдителни приноси с теоретично и научно-приложно значение, от които искам да акцентирам следните:

-за първи път у нас е проведено молекулярно типизиране на НДРБД със съвременен метод за паралелно екзонно секвениране и е установен молекулния профил на туморите.Установената при тях генетична хетерогенност и откритите водещи в патогенезата мутации попълват базата данни за раковия геном и могат да служат като прогностични и предиктивни маркери при терапията.

- доказани са фармакогенетично свързани полиморфизми в гени , които са ангажирани в лекарствения метоболизъм и имат отношение към ефективността на терапията, страничните ефекти от нея и са маркери за

индивидуализиране на терапията.

-за първи път у нас със разработен въпросник е проучена мотивацията на пациентите с рак на белия дроб да участват като активна страна в терапевтичния процес. Обобщените данни от представителната група обработени с факторен анализ имат определено приложно значение.

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.

Критични бележки:

-удачно е в литературния обзор да има подзаглавия, за по-лесно възприемане на дискутираните проблеми.

-в авторефератът в табл. № 33 не са представени фармакогенетичните варианти за пациент №20 (има ги в табл.48 на дисертацията).

-фигура № 2 е желателно да бъде в по-голям мащаб, защото е трудно четлива

-някои по-малки таблици, като №№ 4 и 5 по-добре биха се възприемали, ако са представени на една страница.

- някои фигури, като № 38 се нуждаят от допълнение на легендата към тях за директно възприемане без ползване на текстуалната част.

- на места в целия материал и автореферата има некорегирани правописни грешки.
- по мое мнение библиографията е по- добре да се представи по азбучен ред на авторите.

Отбелязаните пропуски са от техническо естество и не променят заключенията и достойнствата на разработката.

Публикации и участие в научни форуми

По дисертацията докторантката има 6 публикации в пълен текст (4 на български и 2 на английски език), както и 3 разширени резюмета в реномирани чужди списания. Има и 6 участия на международни конгреси.

Заключение

Считам, че дисертационният труд на д-р Наталия Петева Чилингирова отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за неговото приложение.

Разработвания проблем е актуален и с подчертана практическа значимост. Използван е съвременен изследователски метод за анализ на раковия геном и са получени резултати с определен приносен характер, по отношение на молекулярната субтипизация и идентификацията на водещи гени в патогенезата на заболяването, които биха могли да се обсъждат, като мишени за прицелна терапия в бъдеще. Намерените генетични полиморфизми с фармакогенетично значение, несъмненно могат да намерят място при обсъждане и индивидуализиране на терапията с цел минимизиране на нежеланите лекарствени реакции. Резултатите от проучването са намерили място в периодичния медицински печат и са представени на международни научни форуми.

Всичко изложено по-горе ми дава основание убедено да препоръчвам на научното жури да предложи присъждане на научната и образователна степен „доктор" на д-р Наталия Петева Чилингирова.

27.01.2016 г.

Рецензент:
(Проф. д-р Ст. Лалчев, дм)