

РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор” по научна специалност ГЕНЕТИКА, шифър 01.06.06

Автор на дисертационния труд: гл. асистент Светла Георгиева Ангелова, БАН, Институт по физиология на растенията и генетика, Секция по молекулярна генетика

Тема на дисертационния труд: Мутационен статус и профил на епигенетично промоторно метилиране в ATM и CHEK2 гените при български пациенти с рак на млечната жлеза, антитуморна активност на българското лечебно растение *Tribulus terrestris* L

Рецензент: Проф.д-р Димитър Борисов Цингилев ДМН, Началник отделение *in vitro* нуклеарно медицинска диагностика към Национална онкологична болница - СБАЛО, медицински специалности: биохимия, нуклеарна медицина и онкология

Предложения ми за рецензия дисертационен труд включва 190 стандартни страници и е построен по класическия метод за представяне на научна разработка : Увод, Литературен обзор (50 стр), Цели и задачи (3стр.), Материали и методи (14 стр), Резултати (56 стр), Обсъждане (16 стр), Изводи и Литература (499 заглавия).

В литературния обзор авторката подробно и задълбочено разглежда съвременното състояние на въпросите за изясняване молекулярните механизми на канцерогенезата и конкретно при рак на млечната жлеза (РМЖ). Той е полигенно заболяване със сложна мултифакторна природа. Канцерогенетичният процес е многостепенен, свързан с натрупването на генетични и/или епигенетични нарушения в редица гени с регулираща роля в клетъчния цикъл - тумор супресорни гени и протоонкогени. Откриват се най-общо три етапа в канцерогенезата: инициация, пролиферативна активация и прогресия. Единични мутации се срещат често в поцеса на клетъчното делене и те се коригират от репаратурните системи или клетката се насочва към апоптоза. Необходима е каскада от такива изменения 4, 6 дори повече, които да се развият в дъщерните клетки и да се отключи развитието на канцерогенния процес.

Понастоящем по безспорен начин е установено, че в патогенезата на фамилната форма на РМЖ участват BRCA 1/2 гените. При спорадичните случай все още няма еднозначно дефинирани молекулярно генетични промени, независимо от интензивните изследвания за тяхното търсене.

В този контекст са поставените от дисертанката цели и задачи.

Да се проучат мутационните спектри на туморсупресорните гени ATM и CHEK2 при българските пациентки с РМЖ и тяхните корелации с редица други клинични и прогностични фактори.

На базата на усвоените генетични методи да се проучи селективната противотуморна активност към клетъчна линия от РМЖ на българското лечебно растение *Tribulus terrestris* L, като потенциално противотуморно средство.

Материалите на проучването включват 145 болни със спорадичен РМЖ, провели лечение в Торакална клиника на Националната онкологична болница за периода между 2000 и 2003 години. Болните са стадирани по TNM класификацията (Т –размер на тумора, N-засягане на регионалните лимфни възли и Мо-липса на далечни метастази), степента на малигнизирание(G), хистологичния подтип (дуктален или лобуларен) , рецепторите към естрадиола, прогестерона и HER 2, както и по проведеното следоперативно лечение: лъче-, химио- и хормонотерапия. От всички пациентки е получено предварително информирано съгласие за включването им в проучването.

Като контролна група са използвани 50 клинично здрави жени-кръводарителки.

В експерименталните проучвания са използвани две клетъчни линии. MCF10A е получена от нормални епителни клетки на млечната жлеза и не е канцерогенна в имуноподтиснати клетки. MCF7 линията е от карциномни клетки произхождоци от плеврален ексудат, дължащ се на метастаза.

Tribulus terrestris L е едногодишно тревисто растение от семейството на Zigorhillaceae. В България билката се среща най-често в южните райони, като в югоизточните е с най-богат състав. От него са изолирани тотален екстракт и сапонинова фракция, които са приложени при опитите с клетъчни линии.

В проучването са използвани съвременни методи за изолиране на ДНК, полимеразна верижна реакция-PCR и клониране на PCR продуктите, изследване конформациите на едноверижни нуклеинови киселини, секвенционен анализ с прав и обратен праймер, агарна електрофореза за анализ на ДНК и секвенционните продукти, метилационно специфичен PCR, полиакриламидна гел електрофореза и др.

Подробно са описани култивирането на клетъчните линии, получаването и пречистването на екстракти и фракции от *Tribulus terrestris* L, както и методите за третиране на клетките с тях.

Използвани са химикали, праймери и комплекти от реномирани фирми, като някои изследвания са проведени в тясно сътрудничество с водещи български и чуждестранни институти.

Статистическата обработка на получените резултати е извършена с помощта на SPSS софтуерен пакет. За оценка прогностичното значение на ATM и CHEK 2 гените са приложени Fisher exact тест и Chi-squared тест. При изчисление на общата преживяемост е използван метода на Kaplan-Meier, а за определяне на относителния риск е приложен еднофакторен и мултифакторен регресионен анализ(Cox proportional hazards regression model).

Ще комбинирам получените от Дисертантката резултати с тяхното обсъждане.

От туморните проби на болните и от кръвта на контролите е изолирана високомолекулна ДНК, която като количество и качество може да се използва за следващите генетични проучвания.

Чрез PCR-SSCP секвенционен анализ на ATM гена в 145 болни от РМЖ са открити общо 11 мутации (7.6%). Те са локализирани само в 15 и 39 екзони и са от типа базови субституции, водеща до аминокиселинна замяна (мис-сенс) и не засягат функционалните домени на протеина. От тях по-интересна е Ser707Pro, за която напоследък се натрупват данни, че наличието ѝ повишава риска от развитие на карцином. Вероятно при възникване на повреди в ATM гена се генерира нестабилност в клетъчните сигнални пътища, нарушават се репаратурните механизми и се натрупват грешки в други сензори, медиатори или ефектори.

Не са открити данни за аберантно хиперметиране в промотора на ATM гена, което насочва към по-голяма роля на генетичните изменения в процеса на канцерогенезата.

По отношение прогностичното значение на мутантния ATM статус авторката доказва, че той е свързан с хормоналния статус на карцинома. Достоверно понижение на преживяемостта тя установява само в подгрупата с негативен естрогенен рецептор и позитивен ATM статус. Общо взето болни с отрицателни естрогенни рецептори имат по-лоша прогноза. При болни с позитивен ER и ATM статус ефектът на ATM аберантната форма се маскира от по-доброто повлияване след хормонотерапия.

При проучване на мутационния спектър за СНЕК2 при български пациентки, това е първото за страната проучване. Авторката намира мутации в 9.65% от болните, като най-често е базова замяна A-G (Glu79Glu) при 6.20% (9/14). Тази мутация, заедно с още две C-T Thr47Met и C-G Ala507Gly, не са регистрирани и описани в съществуващите до сега базите данни. Тя предполага, че тези мутационни варианти са свързани с известна специфичност на българската популация. Само мутацията C-T Thr47Met засяга функционално ангажиран домен на СНЕК2 протеина. Тази мис-сенс мутация променя аминокиселинния състав в киназния домен и това най-вероятно е свързано с нарушаване на основната функция на белтъка.

По отношение клиничните корелации на тези мутации авторката открива корелация с лобуларния хистологичен тип и с позитивен прогестерон рецепторен статус. Лобуларния хистологичен тип и положителен хормонален рецепторен статус се асоцират с по-добра преживяемост на болните. Независимо от тези благоприятни клинични параметри в изследването при мултифакторен анализ се открива 3.295 пъти увеличение на относителния риск за летален изход от заболяването. Това се потвърждава и по метода на Kaplan-Meier. Не се откриват различия в профила на метилиране при изследваните туморни проби и отрицателните кръвни контроли.

Резултатите от проучванията върху антитуморната активност на тотален екстракт и сапонинова фракция от *Tribulus terrestris* L са показали дозозависим ефект върху преживяемостта на клетъчни култури от тумори на млечната жлеза. В ниски дози 0.06 до 2 микро грама/ мл среда преживяемостта на третираниите клетки не се различава от нетретираниите. С увеличаване на концентрацията се наблюдава стабилно понижаване в преживяемостта на третираниите клетки. Авторката открива леко понижаване в преживяемостта на третираниите със сапонинова фракция клетки в сравнение с тези третирани с тотален екстракт. Тя открива ДНК фрагментация в туморните и в нормалните клетки след въздействието както на тотален екстракт, така и със сапониновата фракция. Отчетеното ниво на фрагментация е по-високо при туморните клетки и не се открива разлика при въздействие на тотален екстракт и сапонинова фракция. Чрез флуоресцентно микроскопски анализ в изследването се откриват само ранни белези за начална апоптоза в нормалната клетъчна линия и такива за късна апоптоза в карциномните клетки - фрагментирани ядра и плазмени мембрани. Максимумът на тези процеси е към 72 час от третиранието. Получените резултати в дисертацията показват, че тоталният екстракт има дозозависим ефект върху скъсяване преживяемостта на туморните клетки и умерено нейно намаление при нормалните клетки, без изразена при тях дозова зависимост. Сапониновата фракция показва по-голяма ефективност върху карциномните клетки. Такива проучвания се провеждат за първи път в страната.

Цитираната литература включва 499 заглавия, от които само три на кирилица. Цитирани са редица български автори, публикували в международни списания. Прави впечатление, че авторите са подредени само по азбучен ред, а не по номера. Не че това е грешно, но в бъдеще не препоръчвам на авторката таква подреждане.

Авторефератът е написан много прецизно, показвайки всички по важни части от дисертацията.

По тази научна разработка авторката има 3 публикации в международни списания с общ импакт фактор 4.006, две участия с доклади, публикувани в пълен текст и още 6 участия научни форуми с доклади, постери или резюмета.

Представена е и справка за 8 цитирания в международни научни списания.

Каква е според мен същността на тази научна разработка и в обобщен вид нейните научни приноси:

1. Това е едно проспективно проучване започнало преди 13 години и е свързано със генетични изследвания на едно от най-често срещаната и с огромно социално значение онкологична локализация - карцином на млечната жлеза. Годишно в страната ни се диагностицират около 3 500 новозаболезели (99%от тях жени), с очевидна тенденция към повишаване на заболяемостта. Съгласно последните ни данни за етиологията на това заболяване са обособени три форми: спорадичен (около 7% от болните), с фамилна обремененост (около 20%) и с наследствена обремененост (5-10%). Дисертантката се насочва към проучване на

мутационния статус и профилът на епигенетичното промоторно метилиране на два тумор супресорно гена с регулаторна роля в клетъчната сигнална трансдукция. Използван е туморен материал от 145 хистологично доказани карциноми, материал достотълен за достоверна статистическа обработка на получените резултати

АТМ генът участва в разпознаването на двойно верижните скъсвания на ДНК и осигурява активен надзор във всеки от контролните пунктове на клетъчния цикъл. Той е най добре изследван при болни от едно рядко автозомно рецесивно заболяване Атаксия телеангиектазия. Проучванията при РМЖ откриват в него герминативни мутации от типа мис-сенс. Ролята на този ген при РМЖ все още не е напълно изяснена и е твърде дискотабилна. Причините за това са ниската мутационна честота и значителната големина на кодиращата последователност. До момента проучванията на АТМ гена в страната ни са спорадични и липсват такива при карциноми.

СНЕК2 е туморосупресорен ген, който има водеща роля в регулацията на клетъчния цикъл и апоптозата. Той е подложен на интензивни проучвания във връзка с процеса на канцерогенеза. Получените резултати показват един твърде хетерогенен спектър на откритите мутации и разлики в тяхната популационна принадлежност. Няма до сега данни за негови проучвания при български пациентки от РМЖ.

2.Тези фундаментални проучвания дисертантката свързва с клиничното протичане на заболяването. За мен беше истинско удоволствие да слушам на вътрешната защита и да чета в дисертацията как един не медик свободно борави със специфични онкологични термини: TNM класификация, грейдинг, хистологични подтипове, рецептори, обща преживяемост, свободен от заболяване интервал и др. Получените резултати дават в ръцете на лекарите допълнителна информация и допълват голямата гама от предиктивни и прогностични фактори. Те са в основата на стремежа за индивидуално лечение на заболяването.Хиперметилацията на ДНК в някои карциноми, например, вече е обект на въздействие от обособена група химиотерапевтици.

3.Дисертантката използва овладените от нея генетични методи за проучване на противотуморната активност на едно растение, срещащо се и в България- *Tribulus terrestris* L. Тотален екстракт от него и сапониновата фракция показват потенциален противотуморен ефект на ниво клетъчни култури от карцином. Това е началния стадий от сложната система за проучване и създаване на лекарствени препарати. Следват изследвания на ефекта в еспериментални модели и добре оформените групи на предклинични и клинични проучвания. Това не може да се извърши без заинтругуване и активно участие на богати фармацевтични фирми.

Моите лични впечатления от дейността на Дисертантката по време на извършените проучвания са твърде ограничени и затова в моята оценка

акцентрирам върху онкологичната страна на извършените изследвания и получените от тях резултати. Тази оценка оставям на другите членове на журито, които я познават много по-добре от мен.

В заключение:

Представената ми за рецензия научна разработка на главен асистент Светла Георгиева Ангелова напълно отговаря на всички изисквания за присъждане на образователната и научна степен „доктор”, поради което убедено припоръчвам на почитаемите членове на научното жури да ѝ присъдят тази степен

08.11.2012

Рецензент:

Проф. д-р Д.Б.Цингилев ДМН