

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд “Генетични и епигенетични промени в туморно-супресорните гени *TP53* и *BRCA1* и протоонкогена *PIK3ACA* и тяхното влияние върху преживяемостта, клинично-патологичните и молекулярни характеристики на български пациенти с рак на млечната жлеза”

на Стефан Симеонов Божанов,

представен за придобиване на образователната и научна степен “Доктор”

по научната специалност „Генетика”

Рецензент: чл. кор. Георги Русев от Институт по молекулярна биология - БАН

Представеният ми за рецензия дисертационен труд на Стефан Божанов е посветен на изследването на ефекта на различни генетични и епигенетични промени в три гена – два туморсупресорни гена *TP53* и *BRCA1* и един протоонкоген *PIK3ACA*, върху вида на туморите на млечната жлеза и преживяемостта на българските пациенти с такива тумори с цел да се открият молекулярни маркери с диагностична и прогностична стойност. Ракът на гърдата е най-често срещаното онкологично заболяване при жените. Годишно в България се диагностицират над 3600 нови случая, а около 1100 умират от това заболяване. То може да възникне поради различни причини и в зависимост от това прогнозите за неговото развитие и лечение са различни. Най-общо, когато ракът на млечната жлеза е в резултат на епигенетични промени, прогнозите са по-добри, тъй като епигенетичните промени в организма са обратими. Когато ракът е резултат на мутации в ДНК, т.е. на генетични промени, прогнозите са по-неблагоприятни, въпреки, че и в този случай зависят от това в кои гени е настъпила мутацията. Изхождайки от такива съображения дисертанта е изследвал генетичните и епигенетични промени в български пациентки с рак на гърдата в три гена - *TP53*, *BRCA1* и *PIK3ACA*. *TP53* е един от най-универсалните тумор-супресорни гени, който контролира клетъчния цикъл и играе важна роля при клетъчното делене, *BRCA1* участва в репарацията на

увредена ДНК и специфично се свързва с възникването на рак на гърдата, а *PIK3CA* е една сравнително неспецифична протеинкиназа, която фосфорилира многобройни и разнообразни субстрати. И трите гена играят важна роля при възникването и прогресията на рака на гърдата и поради това считам, че изследванията описани в дисертацията на кандидата имат първостепенно теоретично и практическо значение.

Дисертационният труд е написан според класическата схема на 145 машинописни страници и е богато илюстриран с 20 фигури и 10 таблици. Цитирани са 279 литературни източника, от които един на български език и останалите на латиница. Дисертационният труд съдържа следните части: Литературен обзор – 38 стр., Цели и задачи – 1 стр., Материали и методи – 18 стр., Резултати – 20 стр., Дискусия – 9 стр., и Изводи и Приноси 2 стр. Представен е списък на публикациите във връзка с дисертацията, който съдържа 3 статии и списък на участията в научни форуми, който съдържа 10 участия. Представен е и списък със заблязаните цитирания на статиите на дисертанта, който съдържа 13 цитата.

Литературният обзор е написан компетентно и балансирано. В него са описани основните характеристики на рака като генетично заболяване, като специално е обърнато внимание на рака на млечната жлеза. Разгледани са неговата етиология и клинично-патологични характеристики и са разгледани както рисковите, така и наследствените фактори, които могат да го предизвикат. По-нататък са разгледани подробно и последователно структурата и функцията на трите гена, които се изследват в дисертационния труд, като специално е обърнато внимание на известните мутации в тях и връзката им с рака на млечната жлеза. Накрая е отделено място за метилирането на ДНК и ролята му като епигенетичен фактор. Литературният обзор показва, че дисертанта е подробно запознат с проблемите, които са обект на настоящата дисертация.

В раздела Материали методи са описани пациентите използвани в настоящето изследване, както и методиките чрез които е проведено то. Използван е туморен материал от 145 пациентки с рак на гърдата, които са били контингент на Болницата по Онкология в София. Диагнозите и клинично-

патологичното описание на туморите са направени от компетентни лекари специалисти. За анализ на пробите са използвани широк кръг молекулярно-биологични и клетъчно биологични методи. Описани са различни методи за култивиране и анализ на клетки, както и за изолиране и анализ на ДНК и белтъци. Използвани са различни типове електрофореза на ДНК, различни типове полимеразна верижна реакция, секвениране на ДНК, блотинг на белтъци и др. Използваните методи са напълно адекватни за решаване на поставените задачи и получените резултати не будят съмнение. Те характеризират дисертанта като опитен експериментатор в областта на молекулярната генетика, който владее и компетентно използва най-модерните молекулярно-генетични методи.

В раздела Резултати са описани следните получени резултати. Генетични изменения в *TP53* са били намерени в ДНК от туморите на 19 пациентки (20%), като 2 от тези мутации са описани от дисертанта за пръв път. Най-общо сравнението на вида на мутациите и туморната прогресия са показали, че мутации в *TP53* водят до по-агресивно развитие на рака и намаляват преживяемостта на болните. Намерено е, че рискът за фатален изход за болни с мутации в *TP53* е 2.31 пъти по-голям отколкото за болни с див тип *TP53*. Тези резултати имат важна прогностична стойност. Намерено е също така, че при болни с нарушена функция на *BRCA1*, нарушената функция по-често се дължи на епигенетично инактивиране на транскрипцията на гена поради хиперметиране на промоторната област, отколкото на генетични мутации в екзоните. Този резултат е от особено значение, тъй като метилирането на ДНК е обратимо и при подходящо третиране функционалната активност на гена може да се възстанови. Изследването на третия ген, а именно *PIK3CA* е показало, че той е мутирал в най-голям брой от пациентите – 31%. Също така, до известна степен неочаквано, докторанта е установил, че при съответното лечение прогнозата е по-благоприятна за пациенти с мутации в гена, отколкото за пациенти носители на дивия тип алел. Този резултат показва, че или наличието на мутации в гена не е свързано с малигнения процес, или че инактивирането на гена усилва ефекта на терапията. Възможно е функционално активния *PIK3CA*

по някакъв начин да интерферира с терапевтичните агенти, като намалява действието им.

В раздела Дискусия е направено обсъждане на биологичната значимост на получените резултати. Направен е анализ на известните мутации в трите гена и в този контекст са обсъдени установените в българската популация мутации. Направен е подробен анализ на преживяемостта на пациенти от различни възрастови групи и с различен тип тумори във връзка с вида на установените мутации в *TP53*. Специално е разгледана ролята на хиперметилрането на *BRCA1* като онкогенен фактор, както и връзката му с преживяемостта на пациентите. Що се отнася до влиянието на мутациите в *PIK3CA* върху изхода от заболяването в литературата данните са противоречиви. Дисертантът е разгледал компетентно различните данни и е предложил възможно обяснение на наблюдаваното увеличение на продължителността на живота на болните с мутирал *PIK3CA*, като е предположил, че то би могло да се дължи на терапията.

Въз основа на получените резултати са формулирани 6 извода и 4 приноса, които приемам за нъпълно достоверни. Имам забележка по отношение на формулирането на приносите. Дисертантът изрично подчертава, че установените закономерности се отнасят за български пациенти, но всъщност повечето от тях, например по-агресивната прогресия на болестта при мутирал *TP53*, или факта, че *BRCA1* се инактивира предимно епигенетично, са валидни за всякакви пациенти. Проектът за автореферат правилно отразява основните достижения описани в дисертационния труд. Резултатите от изследванията са публикувани в 3 научни статии в реномирани международни списания с общ импакт фактор почти 5 и вече са забелязани 13 цитата. В 2 от 3-те статии докторанта е водещ автор, което потвърждава неговата решаваща роля при изработването на публикациите. Резултатите са докладвани и на 10 научни форума.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Стефан Симеонов Божанов е посветен на важен и модерен научен проблем в областта на молекулярната генетика. Той има приносен характер и получените резултати биха могли да се използват при диагностиката и терапията на пациенти с рак на млечната жлеза. Дисертационният труд е изработен на високо технологично ниво и разкрива автора си като високо квалифициран и компетентен молекулярен генетик. Спазени са всички изисквания на Закона за развтие на академичния състав и Правлника за приложението му, както и правилника на ИФРГ. Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемото Жури да присъди на Стефан Симеонов Божанов образователната и научна степен Доктор по начната специлност Генетика.

02.01.2014

София

/чл. кор. Г. Русев/