



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 „Изследване на молекулярно-генетични маркери при пациенти с остра миелогенна левкемия“

Автор: д-р Диннар д-р Диннар Али Яхя

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-109-82 / 21.03.2024 г. на Ректора на МУ – Варна съм назначена за член на Научното жури, а на основание Протокол №1 / 22.03.2024 г. от първото (он-лайн) заседание съм определена за председател на Научното жури и рецензент на дисертационния труд на д-р Диннар д-р Диннар Али Яхя за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ по научна специалност „Генетика“.

Д-р Яхя е зачислена като редовен докторант по „Генетика“ със срок на обучение от 3 години. (Заповед Р-109-475 / 04.11.2020 на Ректор на МУ-Варна). Етапите на докторантурата за допускане до публична защитата са спазени и докторантът е отчислен по предложение на проведено заседание на Катедрен съвет на Катедра „МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА“ съгласно чл. 61, ал. 1 и ал. 2 от Правилника за развитие на академичния състав в МУ – Варна след *вътрешна защита*.

Дисертационният труд е изработен в Катедра по Медицинска генетика на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна; Лаборатория по медицинска генетика към УМБАЛ „Св.Марина“ЕАД Варна. По процедурата за защитата, д-р Яхя 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 Диннар Али Яхя е родена на 21.01.1994 г. в гр. Исперих. Завършва средното си образование в СУЕО „Александър Пушкин“ в гр. Варна през 2011, а висшето си образование по медицина – с отличен успех в Медицински университет „Проф.д-р Параскев Стоянов“ Варна през 2017 г. (Диплома № 005055/2017). През 2019 г започва работа като редовен асистент в Катедра по Медицинска генетика на МУ Варна и като лекар-специализант в Лаборатория по медицинска на УМБАЛ „Св.Марина“ ЕАД Варна.

Придобива специалност по Медицинска генетика пред Държавна изпитна комисия в гр. София (Диплома № 026565 / 2023). Изгражда преподавателски умения за медици (българо- и англо-езиково обучение), фармацевти и специалисти „Медицинска сестра“. А така също лабораторни и консултативни компетенции за работа в лабораторията.

Прави впечатление широкият спектър от интереси на д-р Яхя като участия в 17 квалификационни *курсове и специализации* в това число за обмен с асоциирани партньори по проект № BG05M2OP001-2.016-0025 „Създаване на мултидисциплинарна образователна среда за развитие на кадри с интегрални компетентности в областта на биомедицината и здравеопазването“, град Констанца, Румъния, през ноември 2023 г. През същата година е и наградена като *ментор* по проект за научен обмен на двама чуждестранни студенти, (SCORE), организиран от IFMSA (International Federation of Medical Students' associations).

Д-р Яхя е съавтор на общо 6 публикации в **пълен текст**, 4 от които в списания, индексирани в Web of Science или Scopus (*Romanian Journal of Internal Medicine, Cytology and Genetics, Педиатрия*), в т.ч. 1 в списание с IF. Публикации в **резюме** - 22 броя, от които 11 в списания с IF (*Prenatal Diagnosis, European Journal of Human Genetics*), ECA newsletter и др. Главен изпълнител е на 1 научен проект финансирани от Фонд „Наука“ МУ Варна по темата на дисертационния и труд

Членува в Българско Дружество по Генетика и Геномика на Човека, Национално Дружество по Хематология и Хемотрансфузия, European Society of Human Genetics (ESHG), European Cytogeneticists Association (ECA), International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD).

Владее свободно 4 езика, извън български език (английски, турски, руски) и базово (италиански).

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е представен в 130 страници, съдържа 15 фигури и 12 таблици. Включва: съдържание (2 стр.), съкращения (3 стр.), въведение (3 стр.), литературен обзор (43 стр.), работна хипотеза, цел и задачи (1 стр.), клиничен контингент и методи (7 стр.), резултати от проучването (14 стр.), обсъждане (22 стр.) (заключение и насоки за бъдеща работа (3 стр.), изводи (1 стр.), приноси (1 стр.), библиография (24 стр.), Приложения 1,2 (5 стр.), публикации по дисертационния труд (1 стр.), благодарности. Библиографията обхваща 201 литературни източника, от които 5 на кирилица и 196 на латиница. Ползваните заемки от фигури и фотоси са с цитирана принадлежност на референтен автор.

Авторефератът, 52 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 съвременна молекулярна – генетична диагностична оценка при пациенти със значимо онкохематологично заболяване - Остра миелогенна левкемия (ОМЛ). Общоприетите международни препоръки с цел стратификация спрямо риск включват не само задължително провеждане на конвенционален хромозомен анализ (КЦА), но и молекулярно-генетични методи. Методът на флуорисцентна ин ситу хибридизация FISH все повече се замества от молекулярно-генетичен метод с използване на набор от гени до целогеномен анализ. Генетичната основа на неопластичния процес осигурява достъпна и надеждна преценка и стратификация чрез КЦА на клетъчно ниво и чрез бърз, лесен за изпълнение и приложимост метод MLPA (Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification) за отчитане на молекулярно-генетични маркери, характерни за ОМЛ. Така се добива по-цялостна и точна представа за подлежащия генетичен механизъм, с максимално персонализиран подход и шанс за благоприятен изход от заболяването.

Литературния обзор впечатлява с обема си, унагледен с 4 фигури и 6 таблици. В него авторът задълбочено систематизира научната информация по разработваната тема, като: 1) Молекулярни основи и същност на ОМЛ; Генетична характеристика и класификация на ОМЛ; и Стратификация спрямо риск според ELN; и 2) Най-често използвани молекулярно-генетични маркери и методи за тяхното разкриване.

Представена е богата научна библиография, която показва най-актуално, вкл. до 2023 г., познание на използването на генетичните характеристики на ОМЛ. Включени са 5 разработки от български автори в научното и приложно поле на заболяването.

Обобщението систематизира научните данни и логично води към изграждане на *Работна хипотеза* с основателни аргументи за избора на разработваната тема: MLPA е подходящ метод за изследване на молекулярно-генетични маркери и би било удачно да бъде внедрен в рутинната оценка на генетичната основа при пациенти с новодиагностицирана ОМЛ, успоредно с цитогенетичния анализ.

Целта на дисертационния труд е формулирана ясно - Да се оцени приложимостта на метода MLPA (Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification) за отчитане на характерни за ОМЛ молекулярно-генетични маркери в рутинната клиничко-диагностична дейност за оценка на пациенти с новодиагностицирана ОМЛ. За постигането на тази цел са формулирани **5 задачи**, които са логически свързани и в синтезиран вид.

1. Да се въведе молекулярно-генетичен метод за идентификация на значими молекулярно-генетични маркери, свързани с ОМЛ.
2. Да се селектират пациенти с новодиагностицирана ОМЛ, отговарящи на критериите за включване в проспективното проучване.
3. Да се проведе молекулярно-генетичен анализ на ДНК, изолирана от левкоцити от венозна кръв от пациенти с новодиагностицирана ОМЛ преди лечение, и от контролна група от здрави индивиди.
4. Да се съпоставят данните с тези от успоредно проведен КЦА, и да се обобщят и анализират резултатите от проведеното молекулярно-генетично изследване.
5. Да се обобщи ролята на използвания молекулярно-генетичен метод в инициалния генетичен скрининг и да се изведат насоки за подобряване на генетичната оценка на контингента новодиагностицирани пациенти с ОМЛ.

Особен акцент отдавам на трета задача, свързани с възможността да се въведе използване на молекулярно-генетичен метод при хематологично заболяване в нашата страна и пета задача обобщаваща данните за извеждане на насоки за работа при пациенти с ОМЛ.

Материал и методи - разделът е представен в достатъчен обем. Проучването е проспективно по своя характер за период от 16 месеца (февруари 2022 - май 2023). Пациентският контингент е регистриран в университетската клиника по хематология на УМБАЛ „Св. Марина“ Варна, а генетичните изследвания са провеждани в Лаборатория по Медицинска генетика на същата болница.

Посочени са включващите и изключващи критерии при подбора на пациенти и основанието за това. Ясно е описана процедурата по набиране на групата с личен контакт на докторанта за целите на вземане на Информирано съгласие от всяко лице (Приложение 1 и 2). Описана е и контролната група участници. Пациентите са диагностицирани съгласно общоприети диагностични и риск стратифициращи критерии на Международната работна група по левкемии. Документалният метод включва и използване на информация от болничната електронна база данни.

Лабораторно-генетичните методи (изолиране на ДНК, MLPA - Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification, и Конвенционален цитогенетичен анализ) усвоени и прилагани от докторанта са описани подробно в лабораторни протоколи. Използван е статистически панел с набор от 4 групи статистически методи с конкретно поставени групи въпроси и софтуерни продукти, лично дело на докторанта.

Забележка – към този раздел се посочват и броя на изследваните пациенти с различни методи и принцип за позразделяне по показания, извън охарактеризирането в раздел Резултати.

Резултатите са представени в отговор на поставените задачи и са онагледени с 14 фигури и 5 таблици, чието приложение не дублира текста. Според вида на поставените въпроси за разрешаване и проведените проучвания, резултатите са групирани в:

- Дескриптивно – епидемиологична характеристика на пациентите и доброволците, включени в проучването (възраст, пол, показания)

- 2) Представяне и анализ на резултатите от проведени генетични изследвания (MLPA и Конвенционален цитогенетичен анализ в съпоставка с MLPA

За периода на проучването са изследвани общо **61 пациенти и 21 контроли**.

Изследване чрез MLPA е проведено при всички 61 лица, а конвенционален цитогенетичен анализ е приложен при 53 пациенти, като е постигната успеваемост в 38 (71,7%) (*добра **методична** успеваемост за добив и анализ на костно-мозъчни култури при пациенти с ОМЛ*). Смятам за много удачна Таблица 12, отразяваща конкордантност между находките от MLPA и КЦА.

Сравнението на двата метода по отношение на цялостната им успеваемост и информативност (графично представено на Фигура 11) е акцент в съпоставимостта на двата генетични метода. По отношение *успеваемостта* от приложението на двата метода, тя е в полза на MLPA над КЦА, с голяма статистическа значимост ($p < 0,00001$, Chi-square test). По отношение *разкриваемостта на патология* на двата метода няма статистически значима разлика – 55,7% за MLPA и 39,6% за КЦА. ($p = 0,08544$, Chi-square test). Много важна е, обаче, отчетената сумарна разкриваемост от приложението на комбинация от двата метода за 48 (78,7%) пациенти. Нещо повече - в 18% ($n = 11$) от всички изследвани, MLPA дава информация за находки, пропуснати от КЦА.

Внимание привлича оценката, която прави докторантът за средна преживяемост на пациентите, разпределени в рискови групи по ELN 2022 (Kaplan-Meyer test, GraphPad Prism), по пол и по възраст.

Намирам за много съществено и наблюдението, свързано със стратификацията по подтип ОМЛ по WHO 2022. На практика се оказва, че най-многобройна е групата на *некласифицираните* пациенти – 37,7% ($n = 23$) било поради липса на открита генетична промяна и чрез двата метода или поради невъзможност наличната генетична промяна да се класифицира. От *класифицираните* пациенти, водеща е групата на МДС-свързаните промени – 23% ($n = 14$).

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

Дискусията е основният 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 два подраздела са обсъдени резултати от дескриптивно – епидемиологична характеристика на участниците в проучването, по отделно резултатите от проведените генетични изследвания чрез MLPA и КЦА.

Резултатите от проучването сочат, че комбинацията от КЦА и MLPA чувствително повишава количеството открити генетични маркери.

По отношение приложението на MLPA – методът позволява откриване на моногенни и някои хромозомни изменения, пропуснати при КЦА; диагностицират се и нови за практиката у нас моногенни маркери (в гените *NPM1*, *IDH2*, *DNMT3A*). Анализирани са и ограниченията на метода, свързани с целевата успеваемост: а) таргетен характер, определян от вида на включените сонди, б) различна чувствителност по отношение на моногенни варианти, делеции и дупликации, съответно 5-10%, 20% и 40%,

в) избор за биологичен материал при миелоидни неоплазии – костен мозък, а не периферна кръв, г) ограничено количество публикации за методично сходни проучвания.

По отношение приложението на *КЦА* се установява, че той запазва водещата си роля като метод за детекция на бройни и груби структурни хромозомни изменения. Чувствителността към нискостепенни клонове и балансирани преустройства допълнително стабилизира ролята му в инициалната оценка на пациенти с ОМЛ. Обсъдени са и особеностите на метода свързани с а) ниска разрешителна способност и неразпознати транслокации, б) необходимост от култивиране на клетки и липса на метафазни пластинки за анализ в) техническите проблеми, свързани с източника на биологичен материал, отказ или невъзможност за провеждане на костно-мозъчна биопсия.

Авторът обобщава, че недалечното бъдеще принадлежи на бързите и широкообхватни генетични изследвания визуализиращ голям диапазон от структурни и бройни генетични промени. Такъв е молекулярно-генетичен *целогеномен* метод, Optical Genome Mapping (OGM) (Bionano Genomics, USA), засега с висока цена, добив на големи количества информация налагащ сложна биоинформатична обработка с интерпретация от специализиран персонал.

В соята дискусия докторантът оценява и разкритите генетични находки 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.

Коментирани са скоростта на развитие и възможността за обхват на пациентите с ОМЛ за инициална диагностична оценка и терапия. Тези фактори, отразяващи се на изхода на заболяването на пациентите адресират нуждата от информираност на обществото за ефективна профилактика и подобряване на масовата здравна култура като цяло.

Изключително задълбочено, разбираемо, свързано и актуално представен основен раздел от дисертационния труд.

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

1. Сред селектираните пациенти с новодиагностицирана ОМЛ се отчете явен превес (над три четвърти – 78,7%) на тези без други предходни хематологични (вкл. малигнени) заболявания.
2. MLPA позволи откриване на моногенни и хромозомни изменение при повече от половината (55,7%) от пациентите, което допринесе за тяхното успешно класифициране и стратифициране на повечето от тях спрямо риск съгласно актуалните международни класификации.
3. Чрез използвания нов за нас метод се диагностицираха нови за практиката ни моногенни маркери (в гените *NPM1*, *IDH2*, *DNMT3A*), каквито бяха отчетени у една трета (34,4%) от всички изследвани пациенти.
4. Методът MLPA позволи допълнително разкриване на хромозомни изменения спрямо КЦА, като MLPA даде информация за находки, пропуснати от КЦА при една пета (18%) от всички изследвани.
5. При близо една трета (27,9%) от пациентите при конвенционалния цитогенетичен анализ бе открита патология без аналогичен резултат от молекулярно-генетичния метод.
6. Комбинацията от двата метода – цитогенетичен и молекулярно-генетичен, даде информация за мнозинството (78,7%) от нашите пациенти.

Приемам самооценката на автора за **приносите** на дисертационния труд, оформени в 3 групи.

Приноси с оригинален характер

1. За първи път в нашата страна се извършва и представя систематизирана информация и анализ на резултати от приложение на метода MLPA с оценка на неговия принос в обслужването на новодиагностицирани пациенти с ОМЛ над 18-годишна възраст. Получените резултати са база за сравнителни проучвания на национално и международно ниво.
2. Настоящата работа е едно от малкото проспективни проучвания у нас, разглеждащи и сравняващи диагностична успеваемост на генетичните лабораторни методи – в случая КЦА и MLPA, по отношение на този контингент пациенти с извличане на изводи за рутинната клиничко-диагностична практика.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е трайната роля на цитогенетичния метод като практичен и изпитан такъв в уточняването на значими бройни и големи структурни хромозомни маркери, включени в съвременните класификации и алгоритми за терапевтично поведение.
2. Потвърдена е необходимостта от надграждане приложението на конвенционална цитогенетика със съвременни високо-резолютивни молекулярно-генетични методи за възпрепятстване на чести проблеми при последната и уточняване на по-детайлни, включително моногенни соматични промени при тези пациенти.
3. Потвърдена е водещата роля на комбинацията от цитогенетичен и молекулярно-генетичен метод в лабораторната диагностика за разкриване на генетичната основа на заболяването при пациенти с ОМЛ.

Приноси с приложен характер

1. Въведен е метод за молекулярно-генетичен анализ - MLPA, за генетичен скрининг на пациенти с новодиагностицирана ОМЛ, успоредно с рутинно провеждания цитогенетичен анализ в рамките на дейността на Лабораторията по медицинска генетика, Варна.
2. Изведени са насоки с цел подобряване на генетичната оценка на контингента новодиагностицирани пациенти с ОМЛ, касаещи подбора на генетични лабораторни методи, биологичен материал и генетични маркери.

Смятам за резонно и възможно обединяване на по два от приносите с потвърдителен (2 и 3) и с приложен (1 и 2) характер.

Трудове във връзка с дисертацията

По научната си разработка д-р Яхя е представила 3 пълнотекстови публикации в научни списания и 4 публикации на резюмета. Всички те са с **водещо** нейно авторство и **актуалност**: *Romanian Journal of Internal Medicine* (2022, 2023), сп. *Варненски Медицински Форум* (2022) (изискуемо по защита на проект към НИМУ Варна), *European Journal of Human Genetics* (2022), 13th *European cytogenomics conference* (2021) ECA newsletter, XII Национален конгрес по хематология (2023).

Критични бележки, коментар и препоръки към дисертационния труд:

Обобщеното ми виждане върху научната разработка е, че по същество тя представя придобит лабораторен (лично умение и изработване) и анализаторски опит за молекулярно-генетично изследване на новодиагностицирани пациенти с ОМЛ в помощ на клиничната онкохематологична практика.

Намирам за особено подходящо и ценно включването на раздел „Заклучение и перспективи за бъдеща работа“, в която докторантът кратко отразява същността на изследователския труд и извежда насоки за действие - на фона на лимитирано финансиране *понастоящем въвеждане на MLPA* като скриниращ метод при такива

пациенти, с разширяване на контингента (педиатрични пациенти) и продължителността на проследяване, при използване на костно-мозъчен материал за ДНК източник. Сърдечно ѝ препоръчвам научно развитие в посока онкохематология.

В личен план - познавам докторантката д-р Яхя от постъпването ѝ в Катедрата по Медицинска генетика през 2019 г. 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. Колаборативен колега, бързо придоби умения за работа както в катедрата, така и в лабораторната структура, използва четири езика и има много добри технически умения.

Заключение:

Дисертационният труд на д-р Яхя демонстрира задълбочени литературни познания по актуална тематика, много добри възможности за боравене с лабораторни и статистически методи на изследване, умения за писмено изложение и обсъждане на научни данни в областта на генетичните науки с клинично приложение. Докторантът покрива наукометричните критерии съобразно правилника за академично развитие на МУ-Варна за присъждане на научно-образователна степен „Доктор“. Убедено препоръчам на научното жури да присъди научно-образователна степен „доктор“ по научна специалност „Генетика“ на д-р Диннар Али Яхя.



Заличено на основание чл. 5, §1, б. „В“ от Регламент (ЕС) 2016/679
--

28.05. 2024

Рецензент:

ПРОФ. Д-Р ЛЮДМИЛА АНГЕЛОВА, ДМ