

До Председателя на Научното жури,
определено със Заповед N P-109-111/11.03.2022

на

Ректора на Медицинския Университет -Варна

РЕЦЕНЗИЯ

от проф д-р Жасмина Михайлова Миланова, д.м.

Началник Клиника по медицинска онкология към

Катедра „Хематология, онкология, патология и радиобиология “,

Военномедицинска академия, София

Относно: Дисертационен труд на тема: „Единични нуклеотидни полиморфизми в гените за некодиращи РНК-и като диагностични и прогностични маркери при болни с колоректален карцином в метастатичен стадий“ на редовния докторант д-р Ростислав Радославов Манев, за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР“ по професионално направление 7.1. Медицина, от област на висше образование 7.3 Здравеопазване и спорт, по научната специалност „Онкология“ .

Научни ръководители:

доц. д-р Николай Цонев, д.м.

доц. Мария Раданова, д.б.

I. Административна оценка

Д-р Ростислав Радославов Манев е зачислена за докторант в редовна форма на обучение към Катедра по пропедевтика на вътрешните болести, МУ- Варна считано то 16.07.2018 за срок от три години с тема „Експертиза на някои некодиращи РНК като предиктивни и прогностични маркери при болни с колоректален карцином в метастатичен стадий“ с научен ръководител доц д-р

Николай Цонев, дм, със заповед № Р-109-434/16.07.2018 на Ректора на Медицински Университет – Варна.

По предложение на ръководителя на Катедрата по Онкология на базата на протокол 3 от 21.02.2022, дисертационният труд на д-р Ростислав Радославов Манев на тема „Единични нуклеотидни полиморфизми в гените за некодиращи РНК-И като диагностични и прогностични маркери при болни с колоректален карцином в метастатичен стадий“ е одобрен и предложен за отчисляване с право на защита. Със заповед № Р 109-111 от 11.03.2022 на Ректора на Медицинския Университет „Проф д-р Параскев Стоянов“ – Варна, редовният докторант д-р Ростислав Радославов Манев е отчислен с право на защита.

Съгласно заповед номер Р-109-111/11.03.2022 на Ректора на медицинския университет и на основание на Протокол номер 1 от 25.03.2022 е избрано Научно жури в състав на пет хабилитирани лица.

II. Кратки биографични данни

Д-р Ростислав Радославов Манев завършва Националната природно-математическа гимназия „Академик Любомир Чакалов“ в София през 2010г. Д-р Манев завършва медицина в Медицински Университет „Проф. Д-р Параскев Стоянов“- Варна през септември 2016, като от 06.11.2016 започва специализация в Клиниката по медицинска онкология в УМБАЛ Света Марина Варна. От 28.02.2017 е асистент към Катедрата по пропедевтика на вътрешните болести, по-късно преименувана като Катедра по онкология, а от м.07.2018 е докторант в редовна форма на обучение по специалността „ Онкология“.

Д-р Ростислав Радославов Манев е автор 5 пълнотекстови публикации във връзка с дисертационния труд, една от които е в реферирано списание с Импакт фактор - *International Journal of Molecular Sciences*.

Д-р Манев е автор на 6 публикации в абстрактна форма, във връзка с дисертационния труд, всичките публикувани в списания с Импакт Фактор *Annals of Oncology* и *Journal of Clinical Oncology*.

Д-р Манев е член на Български лекарски съюз и на European Society of Medical Oncology (ESMO).

III. Оценка на дисертационния труд

1. Актуалност на темата

Единични нуклеотидни полиморфизми („Еднонуклеотидните полиморфизми“, SNP) са най-простата форма на генетичен полиморфизъм, тъй като се състоят от промяна на единичен нуклеотид в контекста на генетична последователност. Те са хетерогенно разпределени в целия геном и се намират както в кодиращите (екзони), така и в некодиращите (интрони и промоторни региони) области на гените, както и в областите на генома, в които не се намират известни гени (понякога наричани „Junk DNA“).

Единичните нуклеотидни полиморфизми могат да се отразят на различни функционални процеси при злокачествените заболявания, което ги определя за биомаркери за риска от развитие на злокачествени тумори с различни първични локализации.

През последните години много еднонуклеотидни полиморфизми са проучвани в пряка връзка с риска от развитието на коло-ректален карцином.

От друга страна микро-рибонуклеиновите киселини / миРНК/ са РНК-молекули, които играят важна роля в различни биологични процеси, като те некодират протеини, но имат важна функция за релугиране на генната експресия / а именно регулират експресията на протоонкогените и тумор-супресорните гени/.

Единичните нуклеотидни полиморфизми в гените на миРНК –miR-SNPs- могат да модулират експресията на миРНК и така да определят риска от развитие на злокачествено заболяване, като могат да имат диагностична, предиктивна и прогностична функции. Изследванията в световен мащаб за различните функции на miR-SNPs при злокачествени заболявания са малко на брой и то предимно в азиатски

кохорти. Изследвания за значението на miR-SNPs при български пациенти с колоректален карцином не са правени до момента. В този смисъл темата на докторанта е изключително актуална.

2. Обща характеристика на труда

Дисертационният труд е оформен в съответствие с изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България, а именно –разработен е на 146 стандартни страници - от които: „Въведение“ – 2 страници, „Литературен обзор“ – 44 страници, „Цел и задачи на изследването“ – 2 страниц2, „Материали и методи“ – 15 страници, „Резултати“ – 31 страници, „Дискусия“ – 7 страници, „Заклучение“ – 1 страница, „Изводи“ – 1 страница, „Приноси на научния труд“ – 1 страница, „Научни публикации и съобщения свързани с дисертационния труд“ – 2 страници.

Дисертационният труд е онагледен е с 35 фигури и 40 таблици. Библиографският списък съдържа 257 източника, от които всичките са англо-езичната литература.

Научният труд на докторанта д-р Манев е правилно структуриран като последователност и обем на разделите. Има отлична и съвременна визуализация с подходящо избрани графични средства - фигури и таблици.

Авторефератът съдържа 84 страници и отговаря напълно на текста на дисертационния труд.

3. Цел и задачи

Целта на дисертационния труд е ясно формулирана, конкретна и изпълнима:

„Да се идентифицират нови диагностични и прогностични молекулярно-биологични биомаркери при български пациенти, диагностцирани с коло-ректален карцином /КРК/ в метастатичен стадий чрез изследване на пет подбрани единични нуклеотидни полиморфизми в гените, кодиращи микро –РНК-и – **rs7372209** в гена на микро-РНК-26а-1, **rs2910164** в гена на микро-РНК-146а, **rs2682818** в гена на микро РНК-618, **rs353293** в промоторния район на генния клъстер на микро РНК-143 и микро РНК-145 и **rs322931** в гена на микро-РНК-181b“

Поставените 7 задачи са логично обвързани със целта и дават основание да се приеме, че с овладяване и прилагане на методологията на научното изследване, те ще бъдат успешно решени.

В този смисъл са поставят като задачи, да се изследват алелното разпределение и генотипна честота на петте подбани SNPs при болни с мКРК и при здрави контролни и също така да се търси връзка между носилството на определен алел или генотип на изследваните пет SNPs в гените на микро-РНК-и и възможността за бъден предсказан риска от развитие на КРК.

4. Методика на проучването

Осъществено е проучване на 101 пациенти, лекувани в Клиниките по медицинска онкология на Университетска болница Света Марина и на ВМА- София. Тестванията са извършени в Катедра по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика на МУ – Варна. Подробно са описани специфичните методи на изследване като – ДНК екстракция, SNP генотипиране, изолиране на РНК от плазма за изследване на микро-РНКи, изследване на нивата на експресия на циркулиращи в кръвта на миРНК-и. Също така подробно са описани и статистическите методи като метод на статистическа групировка на данните, метод на статистическо оценяване, метод за открива на неслучайни асциации между две категорийни променливи, метод за изчисление на отношението на шансовете, непараметричен анализи, ROC анализ, анализ на преживяемостта, и Cox proportional hazards models. Генетичните модели на унаследяване са оценени чрез анализ на асоциация на изследването SNPs с появата на мКРК.

5. Резултати

Получените резултати са оригинални и са резултат на изследователската работа на докторанта. Резултатите са представени в седем подраздела, а именно

- Клинична и патологична стратификация на пациентите
- Алелно разпределение и генотипна честота на подбраните SNP в селектираната кохорта пациенти с метастатичен КРК

- Сравнение на алелните и генотипните честоти на подобрните пет SNPs в българската група здрави индивиди с наличните данни за други кохорти.
- Асоциация между носителството на определен генотип/алел на изследваните пет SNPs в гените за микро-РНК-и и възможността да предскажат риск от развитие на КРК
- Асоциация между носителството на определен генотип/алел на петте изследвани SNPs в гените за микро-РНК-и и общата преживяемост при пациентите
- Сравнение на нивата в плазмата на микро-РНК-ите, в чийто гени са изследваните SNP - при пациентите с метастатичен КРК и при здравата контролна група
- Асоциация между нивата на експресия в плазмата на микро-РНК-ите, в чийто гени са изследваните SNP и общата преживяемост при пациентите

6. Оценка на дисертационния труд и приносите

Докторантът Д-р Ростислав Радославов Манев е представил изводите и приносите в два раздела, като е формулирал 10 ясни извода. *По-значими изводи:*

- Носителите на доминантния А алел в хомозиготно състояние с rs353293 - miRNA-143/145 се характеризират с висок риск от развитие на КРК.
- ТТ rs7372209 генотипът е оценен като рисков фактор за развитие на тумор в десен колон.
- Изследваният за първи път при пациенти с КРК rs322931–miR-181b полиморфизъм не се асоциира с риска и прогнозата на заболяването.
- Хетерозиготните индивиди с rs2910164 - miRNA-146a се характеризират с нисък риск от развитие на заболяването в свръхдоминантния генетичен модел.
- Полиморфизмът rs2682818 - miR-618 също се проявява като протективен по отношение на КРК и в двата хетерозиготни генетични модела - кодоминантен и свръхдоминантен.

По-значими приноси са:

- За първи път в България са получени данни за ролята на rs2910164–miR-146a, rs2682818–miR-618 и rs353293–miR-143/miR-145 като потенциални диагностични биомаркери за КРК пациенти.
- За първи път в България са получени данни за алелната честота и генотипното разпределение на полиморфизми в гените за некодиращи miRNAs сред здрави индивиди.
- За първи път при пациенти с КРК е изследван rs322931–miR-181b.
- За първи път се докладва асоциация на ТТ rs7372209 генотипа с по-дълга средна OS при пациенти с метастатичен КРК.
- За първи път се докладва асоциация на АА rs353293 генотипа с по-дълга средна OS при пациенти с метастатичен КРК.
- За първи път са изследвани нивата на експресия miR-26a-1, miR-618, miR-181b във връзка с наличие на определен полиморфизъм (rs7372209, rs2682818 и rs322931, съответно).

IV. Научна продукция

Научната продукция на кандидата, свързана с темата на дисертационния труд, включва 11 публикации. Д-р Ростислав Радославов Манев е автор 5 пълнотекстови публикации във връзка с дисертационния труд, една от които е в реферирано списание с Импакт фактор - *International Journal of Molecular Sciences*. Д-р Манев е автор на 6 публикации в абстрактна форма, във връзка с дисертационния труд, всичките публикувани в списания с Импакт Фактор *Annals of Oncology* и *Journal of Clinical Oncology*.

V. Заключение

Дисертационният труд на д-р Ростислав Радославов Манев представлява значимо изследване на тема „Единични нуклеотидни полиморфизми в гените за некодиращи РНК-И като диагностични и прогностични маркери при болни с колоректален

карцином в метастатичен стадий“. Дизайнът на проучването е научно обоснован. Научните методи са подходящи и добре обяснени.

В качеството си на член на Научното жури считам, че представената научна разработка е актуална, акуратно изработена и със значителни приноси за онкологичната наука.

Анализът на резултати показва сходно честотно разпределение на изследваните полиморфизми (rs7372209, rs2910164, rs2682818, rs353293 и rs322931) в гените за миРНК-ите в българските индивиди с това при европейските кохорти. Установява се асоциация с риска от развитие на КРК за три от изследваните полиморфизми в българската кохорта пациенти с метастатичен КРК (rs2910164 в гена за miRNA-146a, rs2682818 в гена за miR-618 и rs353293 в промоторния район на генния клъстер за miRNA-143 и miRNA-145). За два от изследваните полиморфизми е установена статистически значима асоциация с общата преживяемост на пациентите (генотип ТТ за полиморфизма rs7372209-miR-26a-1 и генотип АА за rs353293 в промоторния район на генния клъстер за miRNA-143 и miRNA-145).

Това изследване е първото в България, което проучва и доказва асоциация на единични нуклеотидни полиморфизми в гените за некодиращи РНК-и като потенциални биомаркери, които биха могли предскажат риск от развитие на болестта и имат потенциална връзка с прогнозата на КРК.

Съдържанието на дисертацията, както и получените резултати показват, че докторантът доказва, че е овладял методологията на научното изследване и че е в състояние да я прилага. Всичко това ми дава основание убедено да предложа на членовете на научното жури да гласуват положително за придобиване на научна и образователна степен „ДОКТОР“ по научната специалност „Онкология“ на д-р Ростислав Радославов Манев .

С уважение:

/проф. д-р Жасмина Михайлова, д.м./