



„NON SIBI, SED OMNIBUS“



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ
ЕВРОПЕЙСКИ СТРУКТУРНИ И
ИНВЕСТИЦИОННИ ФОНДОВЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

Проект BG05M2OP001-1.002-0010-C01 „Център за компетентност по персонализирана медицина, 3D и телемедицина, роботизирана и минималноинвазивна хирургия“

РП 1: Персонализирана медицина

Патология и персонализирана медицина



Формат на презентацията

- ✦ *Патоморфология, дигитална и телепатология, морфометрия*
- ✦ *Онкопатология - карцином на бял дроб, гърда и колоректален карцином*



„NON SIBI, SED OMNIBUS”

Основни етапи в дейността

Цел



Научен екип

База

Генетични
изследвания

Задачи

Селекция на пациенти



„NON SIBI, SED OMNIBUS”

РП 1: Персонализирана медицина

А. Патоморфология, дигитална патология, морфометрия и телепатология





„NON SIBI, SED OMNIBUS”

Телемедицина и телепатология

Научна идея на работния пакет

- Оптимизиране на диагностичния процес при интраоперативна и дефинитивна диагностика
 - Приложение на интегративен подход - комбиниращ:
 - Клинични
 - Образни
 - Макроскопски
 - Хистопатологични данни
- С методите на:
- Виртуална микроскопия
 - Телемедицина
 - Телепатология



ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67

Vilppu J Tuominen

Breast Cancer Res. 2010;12(4)

Sample ID: 1
Date: 10.12.2017 11:43
DAB / nuclear area: 41.0%

ImmunoRatio Language:

Introduction Basic mode Advanced mode Help About

Introscope image file(s):
Upload file... No file chosen

View previous image

Sample identifier (optional):

Define a region of interest (ROI) prior to analysis

Analysis settings

Stainfield correction image (optional): No file chosen

Image scale (pixels / μm): (0 = auto-detection)

Brown threshold adjustment: -0.01

Blue threshold adjustment: -0.01

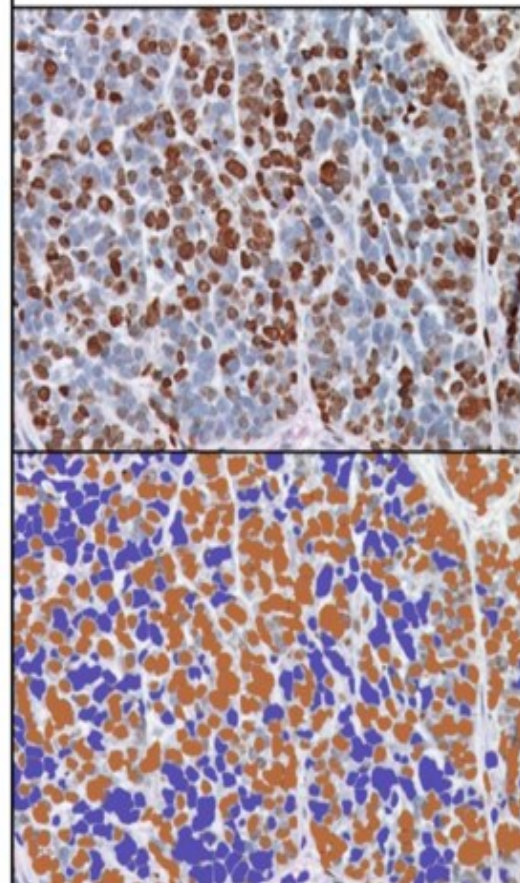
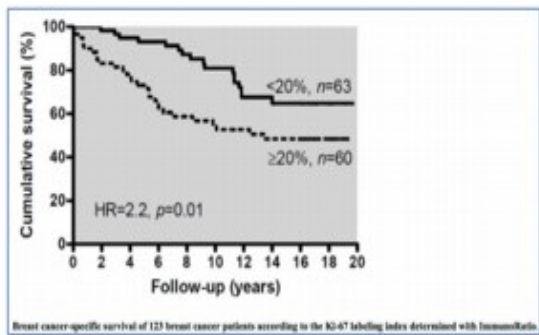
Result correction equation: $y = a + b \cdot x^2 + c \cdot \ln(x) + d \cdot x + e$ None

Results table

Analyze Camera Adjustment Wizard Send feedback

Warning: This image analysis software (ImmunoRatio) is a diagnostic aid for general reference to semi-quantitative samples. Results will always depend on the interaction together with the detection-related image and the original slide. The detection of immunohistochemical events depends on any and all factors for any loss or damage that may arise directly or indirectly by using the software or certain actions. We will not be responsible for any loss or damage. ImmunoRatio is a publicly available software. ImmunoRatio is not a commercial product. All for any purposes other than the intended image analysis purposes. The regions of interest from this system is a 2D layer only. By using the function software, you acknowledge and consent to the following terms and conditions.

©2011 Jarmo Toivola & Vilppu Tuominen (Institute of Biomedical Technology, University of Tampere)





Състав на научния екип

Проф. д-р С. Поповска, д.м.н

Доц. д-р Ив. Иванов, д.м.

Д-р П. Дамянова, Д-р К. Петров

Зорница Петрова, лаборант

Цели:

- Осъществяване на телеконсултации за експресни интраоперативни и конвенционални хистопатологични изследвания
- Архивиране и обобщаване на получените данни
- Организиране на обучителни семинари
- Морфометрия за научни цели в раздел карцином на гърда и колоректален карцином

Доц. д-р С. Трифонов, д.м.

- Архивиране и обобщаване на получените данни
- Организиране на обучителни семинари



Планирани пациенти за включване

- Дейността ще започне от средата на втората година от финансирането на проекта
- В рамките на 2-та до 5-та година ще бъдат изследвани **100 случая**

- Изпълнители:
 - МУ- Плевен
 - Катедра „Патоанатомия”, МУ- Плевен
 - УМБАЛ „Св. Марина“- Варна
 - МБАЛ „Св. Марина“- Плевен
 - УМБАЛ „Д-р Г. Странски“- Плевен



Процедури, на които ще бъдат подложени пациентите

- Паралелно извършване на интраоперативна диагностика по рутинен и с методите на телемедицината
- Валидиране на метода телепатология
- Реализиране на видеоконферентни връзки между операционни зали и биопсичен сектор на Патологоанатомия в реално време

Цел: Създаване на виртуален мултидисциплинарен екип за точна интраоперативна диагностика на туморни лезии, предизвикващи диагностични трудности.



Процедури

- ★ Дигитализиране на макроскопската находка на оперативно отстранени тумори и хистопатологичната находка.

Цел: осигуряване на прецизна окончателна патологична диагноза с интегриране на макро- и микроскопската находка с данните от генетични изследвания на злокачествени тумори на гърда, дебело черво, бял дроб и карцином на яйчници.

- ★ Дигитализиране на трудни диагностични случаи и организиране на телеконсултации

Осигуряване на точна диагностика с водещи специалисти в различни субспециалности



Нова техника, която ще бъде включена в експлоатация

- **Мрежа** и оборудване за видеоконферентни връзки между операционни зали и биопсичен сектор на Патологоанатомия в реално време
- **Станция** за фотодокументация на макроскопски препарати
- Сканираща система за хистологични препарати, позволяваща дигитализация на образи и създаване на виртуални препарати



„NON SIBI, SED OMNIBUS“

Дигиталната патология в центъра за КОМПЕТЕНТНОСТ

• За практиката

- Преподаване на студенти, специализанти
- Изпитване и сертифициране
- Телеконсултации
- Първична точна диагностика
- Външен контрол на качеството
- Морфометрия за диагностични цели
- Дигитална патология и социалните медии

• За изследователски цели

- Морфометрия на образи
- Количествена микроскопия
- 3D реконструкция на образи



Б. Фокус върху онкопатология

★ Класическа, дигитална и молекулярна и патология на солидни тумори

- *Карцином на бял дроб*
- *Колоректален карцином*
- *Карцином на гърда*



„NON SIBI, SED OMNIBUS”

Белодробен карцином: Цел

Изследване на соматични молекулярни сигнатури и техните фармакогенетични варианти при пациенти с авансирал и метастатичен НДРБД с цел определяне на молекулярни подтипове на белодробен карцином и полиморфизми с фармакогенетично значение



Задачи:

Изолиране на геномна туморна ДНК от парафинови блокове и кръвна плазма, определяне на нейното качество и инициране на ДНК банка;

Провеждане на геномно секвениране на селектирани гени от карциноен панел с нова генерация секвенатор при пациенти с НДРБД

-Екзомно секвениране на туморна ДНК

Определяне молекулни подтипове на НДРБД

Търсене на варианти (полиморфизми $>1\%$) с фармакогенетично значение.

Установяване ролята на генетичните нарушения за туморната прогресия;

Оптимизиране на условията в преданалитичната обработка на тъканите за получаване на адекватен материал

Намаляване честотата на получаване на неточни или неадекватни резултати



Методи на изследването

- За генетичен анализ ще се използват фиксирани в парафин материали от пациенти с НДКРБД и кръвна проба след подписване на информирано съгласие.
- от първичен тумор или метастаза или от кръвна плазма.



Методи на генетичния анализ:

qRT-PCR технология за полимеразна верижна реакция в реално време за детекция на соматични мутации и мутации в свободна, циркулираща в кръвта ДНК

NGS – технология за секвениране на гени за детекция на соматични мутации в геномна ДНК и в свободна, циркулираща в кръвта туморна ДНК.

Изследване на най-важни локуси за ракови заболявания в комплексен панел при едновременен анализ на 170 гени и варианти



Планирани пациенти

- В рамките на времетраенето на проекта ще бъдат изследвани до 400 пациенти с хистологично верифициран НДРБД

- За молекулярно генетичния анализ се селектират пациенти с неоперабилен авансирал или метастатичен НДРБД
 - Пациенти с налична тъканна биопсия от парафинови блокове
 - Пациенти за течна биопсия
 - Пациенти с налична тъканна биопсия и течна биопсия



„NON SIBI, SED OMNIBUS”

Състав на научния екип

Проф. д-р С. Поповска, д.м.н

Доц. д-р Н. Чилингирова, д.м.

Д-р.З. Камбурова

- ✦ Хистологично верифициране, клинична оценка, терапевтичен подход при пациенти с авансирал или метастатичен НДРБД; роля на молекулярно -патологичните методи за анализ – “real-time”PCR и екзонно секвениране, анализ на резултати
- ✦ Микроскопска оценка на резултатите от имунохистохимичните анализи

Зорница Петрова, лаборант

Тереза Динева, магистър химия

- ✦ Екстракция на ДНК
- ✦ провеждане на молекулярно-патологични анализи
- ✦ сравнителен анализ на резултатите от различните анализи

База:

**МУ- Плевен Катедра „Патоанатомия”,
УМБАЛ „Д-р Г. Странски“- Плевен**



Очаквани научни резултати и характеристика на научния принос

- Характеризиране на генетичния профил на белодробния карцином, допълване на световната генетична база данни и идентифициране на потенциално нови таргети на лечение

Компетентно първично планиране на терапия, проучване на механизми на резистентност



Колоректален карцином

Цел: Сравнително проучване на морфологичните туморни характеристики, компютърна морфометрия и анализ на имунофенотипа на имунната стромна реакция, мутационен профил при колоректален карцином с лява и дясна локализация

- Анализ на прогностичната и предиктивна стойност на изследваните параметри по отношение на метастазиране на първичния тумор и 5 годишната преживяемост на пациентите



В зависимост от локализацията, КРК може да бъде разделен на два типа:

- Карцином на десен колон-цекум, колон асценденс, флексура хепатика, колон трансверзум /КДК/
- Карцином на ляв колон-флексура лиеналис, колон десценденс, сигма и горна част на анален канал /КРКЛК/



Планирани пациенти

- Таргетна група: 150 случая на пациенти с колоректален карцином.
- Методи: морфологичен, хистологичен, имунохистохимичен метод
- класическа и виртуална микроскопия
- компютър-асистирана морфометрия
- количествено и полуколичествено определяне на прогностични и предиктивни фактори при карциномите на десния и левия колон, с метода на NGS с панел от следните гени: KRAS, NRAS, EGFR, TP53, CTNNB1, PIK3CA, BRAF и др.



Работна хипотеза

- Различия в честота, клинични характеристики и преживяемост на пациентите при отделните туморни локализации
- Различия по отношение на хистологичен тип
- Различия в генетичния и мутационен профил на туморите в зависимост от локализацията, определени с методите на NGS.
- Различия в интензивността и вида на противотуморната имунна стромна реакция



Основни етапи и видове дейности

- Селектиране на пациенти с карцином на дебело черво с различна локализация - десен и ляв колон - на материал от резектат
- Епидемиологично проучване на селектираните карциноми
- Морфологична верификация на карцинома с определяне на хистотип, стадия на заболяването, степен на диференциация на първичния тумор
- Определяне на мутационните характеристики на карцинома от тъканно - базирани биомаркери
- Компютърен морфометричен анализ на стромната възпалителна реакция с определяне на имуноскор на стромната реакция
- Статистическа обработка на резултатите



„NON SIBI, SED OMNIBUS”

Състав на научния екип

Проф. д-р С. Поповска, д.м.н

Доц. Ив. Иванов, д.м.

Д-р Красимир Петров

- ◆ Клинично и хистологично верифициране на КРК
- ◆ Селекция за молекулярно патологичните методи за анализ-NGS
- ◆ Микроскопска оценка на резултатите от имунохистохимичните анализи, компютърна морфометрия

Д-р Зорница Камбурова

Тереза Динева, магистър химик

Зорница Петрова, лаборант

- ◆ Екстракция на ДНК
- ◆ провеждане на молекулярно- патологичните анализи
- ◆ сравнителен анализ на резултатите от различните анализи

База:

МУ- Плевен Катедра „Патоанатомия”,

УМБАЛ „Д-р Г. Странски“- Плевен



„NON SIBI, SED OMNIBUS“

КАРЦИНОМ НА ГЪРДА

Цел:

Проучване на тумор инфилтриращи лимфоцити и някои предиктивни маркери при различни молекулярни субтипове карцином на гърда



Задачи на изследването

- Определяне на молекулярните субтипове карцином на гърда
- Проучване локализация и степен на инфилтрация на първичния тумор от ТИЛ при отделните молекулярни субтипове КГ
- Определяне на субклоновете лимфоцити (Т, В)
- Изследване на имунни и клетъчни маркери- PD-1 / PD-L1, CTLA-4 и някои предиктивни фактори
- Да се потърси връзка между ТИЛ и клинично-патологични характеристики



Научната идея

Допуска се разлика в имунния отговор при различните субтипове карцином на гърда (КГ), като се предполага, че той е най-добре представен при по-имуногенните неоплазми

Работната хипотеза

Съществува разлика в количеството и вида на ТИЛ при различните субтипове КГ както и в експресията на молекулите, участващи в туморния клетъчен цикъл и имунните инхибиторни пътища.



Методи

- Морфологичен (хистологичен)
- Имунохистохимичен
- Класическа и дигитална микроскопия
- Компютър-асистирана морфометрия на имуната стромна реакция на тумора
- Количествено и полуколичествено определяне на прогностични и предиктивни фактори при пациенти с КГ



Планирани пациенти

150 пациенти с морфологично доказан първичен КГ, групирани в четири субтипа (Luminal A и Luminal B- подобни, HER2-позитивен и ТНКГ).

Основни етапи и видове дейности

- Селектиране на пациенти с КГ и добиване на материал със стереотаксична вакуум-асистирана или режеща дебелоиглена биосия, преди планиране на лечението или на материал от резектат след извършена оперативна интервенция
- Морфологична верификация на карцинома с определяне на хистотипа, стадия на заболяването, степен на диференциация на първичния тумор.
- Определяне на молекулярния субтип КГ и прогностични и предиктивни тъканно базирани биомаркери.
- Компютърен морфометричен анализ на стромната възпалителна реакция с определяне на нейния имунофенотип
- Статистическа обработка на резултатите



Състав на научния екип

Проф. д-р С. Поповска, д.м.н
Д-р Полина Дамянова

Клинично и хистологично верифициране на РГ

✦ Микроскопска оценка на резултатите от имунохистохимичните анализи, компютърна морфометрия

Тереза Динева, магистър
Зорница Петрова, лаборант

✦ Екстракция на ДНК

✦ провеждане на молекулярно- патологичните анализи

✦ сравнителен анализ на резултатите от различните анализи



„NON SIBI, SED OMNIBUS”

Очаквани научни резултати и характеристика на научния принос

- Използване на ТИЛ и техните подвидове като независим прогностичен или предиктивен маркер при пациенти с КГ за приложение при таргетна, имуно- или химио и имунотерапия.



Необходимо оборудване за изграждане на иновативна научно- изследователската лаборатория за прецизна онкология

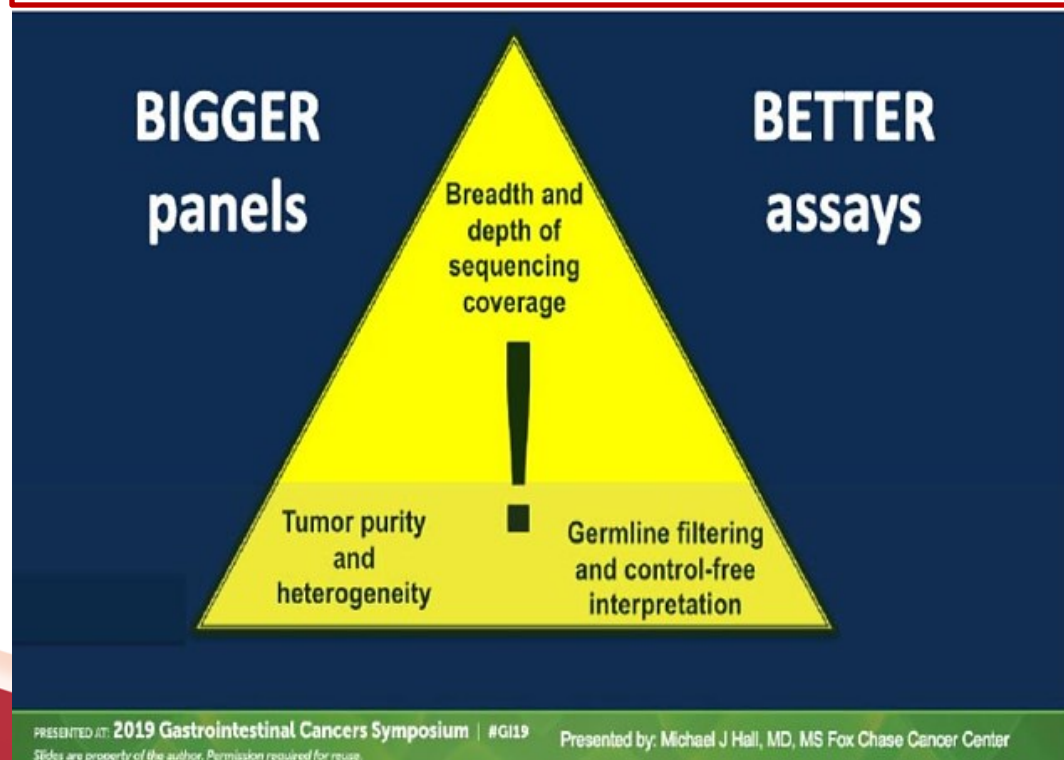
Апарат за новогенерационно секвениране от следващо поколение за екзомно секвениране и сканиране на микроарей чипове, който позволява:

- Оценка на риск и тип рак на гърда
- Количествено измерване на мутационен товар при планиране лечение с имунотерапия
- Изследване на ДНК и РНК за голям туморен панел
- Цялостно екзомно и геномно секвениране на туморна тъкан
- Течно базирана биопсия с панел за голям брой гени



Персонален диагностичен новогенерационен секвенатор, Dx който позволява :

- Таргетно ресеквениране на малки туморни панели – белодробен панел, BRCA1 и BRCA2, панел за колоректален карцином
- Течно базирана неинвазивна биопсия за малък брой гени – бял дроб





„NON SIBI, SED OMNIBUS”

Малък панел от гени за соматично туморно профилиране солидни тумори с новогенерационно секвениране-Dx

AKT1	EGFR	GNAS	NRAS	STK11
ALK	ERBB2	KIT	PDGFRA	TP53
APC	FBXW7	KRAS	PIK3CA	
BRAF	FGFR2	MAP2K1	PTEN	
CDH1	FOXL2	MET	SMAD4	
CTNNB1	GNAQ	MSH6	SRC	



Панел за бял дроб, колоректален, карцином на стомах, овариален карцином, меланом –за развитие на центъра по Компетентност с цел самоиздръжка



Необходимо оборудване за изграждане на иновативна научно-изследователската лаборатория за прецизна онкология

Сет от генетични тестове, процесор и софтуер за анализ на генно – експресионни профили от разнообразни проби - FFPE тъкан, плазма, серум, изолирана РНК, която дава **ВЪЗМОЖНОСТ за:**

- Мултиплексна детекция на десетки до хиляди биомаркери в единична проба
- Автоматизирано приготвяне на библиотеки от mRNA miRNA таргети
- Софтуер за анализ на резултатите от новогенерационното секвениране

С тестове за:

Рак на бял дроб и гърда, колоректален карцином, меланом и др.