

СТАНОВИЩЕ

от

доц. д-р Веселин Т. Беловеждов, дм
Катедра по обща и клинична патология,
Медицински университет - Пловдив

в качеството му на член на научно жури въз основа
на заповед Ректора на МУ - Варна № Р-109-167 / 13.05.2019 г.

относно дисертационен труд на тема

МОРФОЛОГИЧНА И ИМУНОХИСТОХИМИЧНА СРАВНИТЕЛНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ТУМОРИТЕ НА ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА

за присъждане на ОНС „доктор”

с автор д-р Доротея Василева Малинова

научен ръководител проф. д-р Мария Ангелова Цанева, дм

Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология

Факултет по медицина, МУ – Варна

За конкурса са депозираны материали на хартиен и електронен носител - дисертационен труд, автореферат, биографични и професионални данни, административни документи, копия от публикации от д-р Доротея Василева Малинова.

1. Д-р Доротея Малинова е родена на 26 май 1987 г. През 2006 г. тя завършва средно образование, а през 2012 г. приключва успешно следването си в МФ на МУ – Варна, придобивайки магистърска степен по медицина. Веднага след това д-р Малинова започва специализация по обща и клинична патология в Катедрата по „Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология“ на МУ-Варна и през 2017 г. придобива специалност. От 2013 г. и към настоящия момент тя е асистент към Катедрата и лекар в клиниката по „Обща и клинична патология“ на МБАЛ “Св. Марина“ – Варна. От м. май 2016 г. тя е докторант на самостоятелна подготовка.

2. Дисертационният труд на д-р Доротея Василева Малинова е посветен на актуален проблем в областта на човешката патология - туморите на щитовидната жлеза. Точната

диагноза на тези тумори е определяща за лечението, тя изисква познаване на специфичните морфологични особености на всеки тиреоиден тумор, както и на критериите за поставяне на съответната диагноза. Идентифицирането на нови молекулярни биомаркери при тиреоиден карцином в комбинация с морфологичните характеристики гарантира подобряване точността на диагнозата и определяне на прогнозата при пациентите. Важен фактор, имащ значение за оцеляването на неоплазмите, е апоптозата. Апоптотичните протеини са слабо проучени при тумори на щитовидната жлеза, както и връзката им с други имунохистохимични маркери.

Не по-малко съществени са и фоновете заболявания при различните хистологични видове неоплазми на щитовидната жлеза и морфологичните промени в туморната и околната нетуморна тъкан. При наличие на изчерпателна информация и с помощта на съответен панел от биомаркери биха могли да се намерят критерии за разграничаване на доброкачествените от злокачествени неоплазми, за верифициране на отделните хистологични варианти на тиреоиден карцином и, в резултат на това, да се подобри диагнозата и лечението на пациентите. Именно на това е посветен дисертационният труд на д-р Малинова и това го прави особено актуален.

Дисертацията е написана на 156 стандартни страници и е онагледена с 49 фигури и 25 таблици. Литературната справка включва 190 литературни източника, от които 5 са на кирилица и 185 са на латиница.

Литературният обзор е добре структуриран и изчерпателен. В него са описани последователно характеристиките на доброкачествените и злокачествени епителни тумори на щитовидната жлеза. Изтъкнати са диагностичните критерии и класификационните принципи според СЗО от 2017 г., правилата за градиране и стадиране. Обърнато е внимание на мястото и ролята на имунохистохимията за диференциалната диагноза и прогнозата на тиреоидните тумори. Подчертано е, че идентифицирането на нови молекулярни биомаркери при тиреоиден карцином в комбинация с морфологичните характеристики гарантира подобряване на точността на диагнозата и определяне на прогнозата. Посочено е, че маркерът СК19 се експресира при папиларен карцином. Отделено е място и на CD34, който дава информация за туморната ангиогенеза, която е от съществено значение за развитието на туморите. Обърнато е внимание на апоптозата, която има роля за оцеляването на неоплазмите. Тя представлява програмирана клетъчна смърт, обезпечаваща физиологичното равновесие и генетичната стабилност на организма чрез самоунищожение на генетично изменени и дефектни клетки. Апоптотичните протеини каквито са Вах – проапоптотичен и Bcl-2 - антиапоптотичен са слабо проучени при тумори на щитовидната жлеза, както и връзката им с други имунохистохимични маркери. Това подсказва, че тяхното изследване може да хвърли допълнителна светлина за преценка на биологичния характер и прогнозата на тиреоидните тумори.

От обзора става ясно, че не по-малко съществени са и фоновете заболявания при различните епителни видове неоплазми на щитовидната жлеза - хроничен лимфоцитарен тиреоидит и нодозна струма.

На финала на литературния обзор правилно е преценено, че: 1. Адекватната диагноза на щитовидните тумори стои в основата на подбиране на подходяща терапия

за съответните пациенти. 2. Цитологичната и хистологичната диагноза на добре диференцираните тумори, особено на тези с фоликуларен строеж, понякога е предизвикателство за патолозите. 3. Имунохистохимичните изследвания биха могли да подобрят диагностичния процес, стига да са подбрани правилно и да не се разчита на един единствен маркер; тези изследвания, както правилно подчертава авторката, обикновено са икономически по-изгоден вариант от молекулярните и генетичните анализи. Имунохистохимията позволява и търсене на определени протеини в туморните клетки, отговорни за туморната прогресия и метастазиране, което би могло да допринесе за разработване на прицелна терапия при някои пациенти.

На основата на заключенията направени на финала на обзора, дисертантката посочва целта, която си поставя в своята работа, и която смятам за удачна – да се проучи диагностичната и прогностична стойност на морфологичните характеристики и имунохистохимичната експресия на цитоскелетния протеин СК19, съдовия ендотелен маркер CD34, проапоптотичния Вах протеин и антиапоптотичния Bcl-2 протеин при доброкачествени и злокачествени тумори на щитовидната жлеза.

За реализацията на тази цел са поставени следните логични задачи за характеризирани на туморите на щитовидната жлеза – доброкачествени, злокачествени, техните клинично-морфологичните показатели и околните морфологични промени: 1. Определяне на относителния дял на доброкачествените и злокачествени тумори на щитовидната жлеза за период от пет години. 2. Проучване и сравняване на морфологичните промени в туморната и извънтуморна тъкан. 3. Изследване и сравняване на имунохистохимичната експресия на СК19 при тиреоидни неоплазми и в нетуморна тъкан на щитовидната жлеза. 4. Имунохистохимично определяне, чрез маркера CD34, на васкуларизацията на туморната и околната на тумора тъкан и сравняване на МВП в двете локализации. 5. Проучване и сравняване на имунохистохимичната експресия на Вах в туморната и нетуморна тъкан. 6. Оценка на имунохистохимичната реакция на антитяло Bcl-2 при тиреоидни неоплазми и сравняване на експресията с околната на туморите тъкан.

За решаването на поставените задачи са използвани материали от биопсичния архив на Клиниката по обща и клинична патология при УМБАЛ „Св. Марина“. Материалите от пациентите са разделени в три групи: *Първата група* е представена от 607 неселектирани пациенти с хемитиреоидектомия или радикална тиреоидектомия с нетуморни и туморни заболявания на щитовидната жлеза за петгодишен период (2013 - 2017 г.). *Втората група* е представена от 122 селектирани пациента с доброкачествени и злокачествени тиреоидни тумори – 41 фоликуларни аденома, 9 онкоцитарни аденома, 55 папиларни карцинома, 4 фоликуларни карцинома, 3 медуларни карцинома и 6 онкоцитарни карцинома, при които са определени: големина на тумора, наличие на калцификати, наличие на капсула, наличие на тиреоидит, некроза, фиброза, кръвоизливи. *Третата група* материали са изследвани имунохистохимично - 40 парафинови блокчета с тиреоидни карциноми (25 папиларни карцинома, 10 фоликуларни карцинома и 5 онкоцитарни карцинома), 25 блокчета с аденоми (15 фоликуларни и 10 онкоцитарни), и 10 блокчета с нетуморни лезии за контрола от

пациенти без тумори. Количеството на материалите, включващо всички епителни тумори на щитовидната жлеза и околните нетуморни промени дава основание да се очакват адекватни резултатите.

Подбраните методи са резонни - стандартна хистологична техника и оцветяване с оценка на следните морфологични параметри - размер на тумора, като големината се определя спрямо най-големия измерен диаметър на формацията в сантиметри, наличие на капсула, на калцификати, определяне на хистологичния тип на тумора, присъствието или липсата на ХЛТ, на фиброза в стромата и на некрози и кръвоизливи.

За имунохистохимичното изследване на материалите от третата група е използван индиректен имунопероксидазен метод, чрез който са оценени експресията на Bcl-2, Вах, CD34, CK19 китове на фирма „Dako“ и Вах на “Skytex” с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024 при стандартни протоколи.

Получените резултатите са обработени чрез следните **статистически методи**: дисперсионен анализ (ANOVA) за оценка влиянието на даден фактор, вариационен анализ за изследване на количествените характеристики на показателите, корелационен анализ за оценка на зависимостта между изследваните показатели, сравнителен анализ (оценка на хипотези), определяне на диагностична стойност на показател/маркер и графичен и табличен метод на изобразяване на получените резултати. Тези методи определят обективността при преценката на резултатите.

Резултатите са представени в един раздел заедно с обсъждането, като е направено умело сравнение между тях и информацията от литературата. От тях става ясно, че относителният дял на пациентите с туморни заболявания е 49.60% от общия брой пациенти с хемитиреоидектомия и радикална тиреоидектомия. Женският пол преобладава при всички групи заболявания. Карциномите се срещат по-често при млади жени на възраст между 31 и 40 години, докато аденомите са предимно във възрастта между 41 и 50 години. Доброкачествените и злокачествени тумори често са асоциирани с ХЛТ. Тиреоидитът на Хашимото е рисков фактор само за карцином на щитовидната жлеза. Т - стадият на карциномите показва зависимост от фоновото заболяване. При ХЛТ повечето тумори са в T1a стадий, докато при пациентите без ХЛТ мнозинството от туморите са над 1 см и са в T1b или T2 стадий. N-стадият показва зависимост от фоновото заболяване. При наличие на ХЛТ липсват метастази в РЛВ, а при пациенти без ХЛТ, обикновено има метастази в РЛВ. Това, според дисертантката, е възможно да се дължи на протективната роля на лимфоцитарните инфилтрати в паренхима на жлезата при тези заболявания.

Относно морфологичната характеристика на доброкачествените и злокачествените тумори на щитовидната жлеза резултатите показват, че женският пол и фертилната възраст са рискови фактори за развитие на карцином на щитовидната жлеза. Аденомите на щитовидната жлеза имат по-големи размери в сравнение с карциномите (обикновено над 2 см. в диаметър), интактна съединително-тъканна капсула, нерядко с калцификати в нея, съдържат колоид и понякога в тях се откриват фиброзни промени. Карциномите се развиват често на фона на ХЛТ, могат да са частично капсулирани, колоид липсва или е оскъден, в стромата се откриват калцификати и фиброзни промени. Карциномите с малки размери – под 2 см в

диаметър, обикновено са папиларни, докато с най-големи размери са онкоцитарните карциноми. Присъствието на фиброзни промени и калцификати в туморната строма повишава риска от поява на лимфни метастази, което прави наложително клиничното проследяване.

ИХХ изследване показва, че СК19 се експресира по-често при малигнени тумори на щитовидната жлеза, отколкото при бенигнени лезии. Експресията на антитялото при папиларния карцином е значително по-висока от тази при фоликуларен карцином. С помощта на СК19 може да се разграничи фоликуларният вариант на папиларен карцином от фоликуларен аденом и от фоликуларен карцином. Маркерът не допринася за отдиференциране на фоликуларния аденом от фоликуларен карцином. Онкоцитарните неоплазми са негативни за СК19 или експресират маркера само в единични клетки. Онкоцитите при хроничен лимфоцитарен тиреоидит са винаги позитивни за СК19. Интензивното цитоплазмено оцветяване за СК19 при тумори с фоликуларен строеж изисква допълнително морфологично изследване, за да се потърсят типичните ядрени характеристики на папиларния карцином.

Ендотелният маркер CD34, може да се използва като допълнителен критерий при диференциалната диагноза на туморите на щитовидната жлеза. Папиларните карциноми имат най-ниската МВП, констатирана на базата на експресията на CD34, и съдовата мрежа при тях се представя като тип „сито“. За разлика от тези тумори, фоликуларните и онкоцитарните аденоми са с по-висока МВП и съдовата мрежа е тип „цвете“. Най-голяма е МВП при онкоцитарните и фоликуларните карциноми, които нямат характерни черти на съдовата мрежа, в стромата на туморите се откриват дебелостенни съдове.

При туморите на щитовидната жлеза, ролята на проапоптотичния маркер Вах е слабо проучена и данните от литературата са противоречиви. При представено изследване в дисертацията на д-р Малинова се установява, че експресията му е висока при папиларни карциноми. Тя има висока чувствителност (87,50 %) спрямо точното диагностициране на заболяването на пациентите, но има ниска специфичност (48 %), което означава, че не е възможно на базата на експресия на антитялото категорично да се разграничат карциномите от аденомите. Позитивната и негативната предиктивна стойност показват, че маркерът е точен в над 70 % от случаите. Въз основа на резултатите от дисертацията може да се приеме, че Вах има висока диагностична точност по отношение на карциномите и аденомите (72,30 %). При изследване на връзката между експресията на Вах и CD34 се установява обратна пропорционалност - слаба към умерена зависимост. Между експресията на Вах и СК19 се намира умерена правопрпорционална зависимост.

Експресията на Vcl-2 в туморите на щитовидната жлеза е дифузна или фокална, като интензивността на реакцията е умерена или липсва позитивност, както сочат резултатите на дисертационния труд. Папиларните карциноми показат умерена и дифузна реакция. Фоликуларните карциноми и онкоцитарите тумори (аденоми и карциноми) имат умерена експресия на Vcl-2, която е предимно дифузна. При фоликуларните аденоми в половината от случаите експресията на Vcl-2 е дифузна и умерена по интензивност. Зависимост между експресията на Vcl-2 и клинично-

морфологичните показатели като възраст, размер на тумора и фоново заболяване не се установява.

Правопропорционална умерена зависимост се намира между експресията на Bcl-2 и Вах, фактори регулиращи апоптозата. При настоящото изследване се установява, че проапоптотичният протеин Вах липсва в нетуморния фоликуларен епител на щитовидна жлеза, докато антиапоптотичният протеин Bcl-2 се експресира интензивно от тиреоцитите. Вах експресия е установена при папиларни карциноми, докато Bcl-2 експресията при тях не е така интензивна както в нормален паренхим. Това дава основание на авторката да твърди, че при папиларни карциноми – класически и фоликуларен вариант преобладава проапоптотичният фенотип, което е установено и от други автори.

Фоликуларните и онкоцитарите карциноми показват умерена експресия на Bcl-2, предимно дифузна, но от друга страна слаба към умерена, фокална до липсваща експресия на Вах – при тези тумори превалират антиапоптотичните протеини. При онкоцитарните аденоми експресията на Bcl-2 е предимно дифузна и умерена по интензитет, но в половината от случаите Вах също е с дифузна и умерена експресия. Доколкото значението на експресията на апоптотични протеини все още е обект на изследване при туморите на щитовидната жлеза, представените резултати имат своя сериозен принос в тази насока.

На финала на работата са оформени 9 извода, отговарящи на целта и задачите на дисертацията и основаващи се на получените резултати. Те, накратко, са :

1. Хроничният лимфоцитарен тиреоидит корелира с малък размер на карциномите и с липса на лимфни метастази.
2. Фиброзните промени и калцификатите в стромата на карциномите се асоциират с метастази в регионалните лимфни възли.
3. СК19 се експресира интензивно и дифузно при класическия и фоликуларен папиларен карцином, докато при фоликуларния и онкоцитарния карцином липсва експресия или тя е фокална.
4. МВП е най-ниска при класическия и фоликуларния папиларен карцином и съдовата мрежа е тип „сито“. Васкуларната плътност при фоликуларния и онкоцитарния карцином е по-голяма в сравнение с папиларния карцином и в стромата има големи дебелостенни съдове. При фоликуларния и онкоцитарен аденом МВП е по-изразена в сравнение с папиларния карцином и съдовата мрежа е тип „двете“.
5. Вах се експресира дифузно с умерен интензитет при класическия и фоликуларен папиларен карцином и в зони с онкоцитарна метаплазия. Фоликуларните и онкоцитарни аденоми и карциноми показват фокална експресия на Вах протеин или са негативни.
6. Вах протеин не се открива в тиреоцитите при нодозна струма и в нормална щитовидна тъкан.
7. Всички тумори, независимо от хистологичния им вариант експресират Bcl-2 умерено и дифузно. Нетуморните заболявания на щитовидната жлеза показват интензивна и дифузна експресия на Bcl-2 със слаба позитивност в зоните с онкоцитна метаплазия.
8. Онкоцитите при тиреоидит на Хашимото се различават имунофенотипно от неопластичните клетки при онкоцитарните тумори и наподобяват повече на туморните клетки при папиларен карцином.
9. Намалването на МВП в туморите се свързва с повишена експресия на проапоптотичния протеин Вах. Промените на

апоптотичните маркери в туморните клетки (Bax/Bcl-2) се менят заедно с нивата на СК19.

Представеният от д-р Малинова труд съдържа два научно-оригинални приноса :

1. Осъществена е комплексна морфологична и имунохистохимична оценка на туморни и нетуморни заболявания на щитовидната жлеза.
2. Извършен е сравнителен и обобщен анализ на процесите на апоптоза, васкуларизация и експресия на СК19 при доброкачествени и малигнени неоплазми на щитовидната жлеза.

и пет с приложен характер :

1. Потвърдена е връзката между морфологичните промени в съседната на тумора тъкан и карцинома на щитовидната жлеза.
2. Оценена е диагностичната стойност на фиброзните промени и калцификатите в туморната строма.
3. Доказана е потенциалната прогностична стойност на промените в стромата при тиреоидни карциноми.
4. Оценена е диагностичната стойност на СК19, микроваскуларната плътност и апоптозата при различни доброкачествени и малигнени неоплазми на щитовидната жлеза.
5. Създаден е диагностичен алгоритъм за тумори на щитовидната жлеза с фоликуларен строеж.

Резултати от дисертацията са представени в три научни публикации и на три научни форума.

Въз основа на горе изложеното считам, че дисертационният труд на д-р Малинова е напълно завършена работа, която съдържа оригинални резултати и такива с практическа значимост. Мисля, че все пак би било уместно към представената сравнително пълна и пространна морфологична характеристика на тиреоидните неоплазми да се добавят и данни свързани с цитологичната диагностика, която навлиза все по-широко в практиката. Независимо от тази липса трудът на д-р Малинова има достатъчно качества, той отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в България и на условията и реда за придобиване на научни степени в МУ - Варна.

Затова давам позитивна оценка на работата, ще гласувам за, а и си позволявам да препоръчам на членовете на уважаемото Научно жури да подкрепят присъждането на образователната и научната степен „доктор” на д-р Доротея Малинова.

02.06. 2019 г.

доц. д-р Беловеждов

