

РЕЦЕНЗИЯ

**от проф. д-р Ангел Атанасов Ангелов, д. м. н. –
специалност “Патологоанатомия и цитопатология”, гр. Варна**

**на дисертационен труд за придобиване на
образователна и научна степен „ДОКТОР“ по научната
специалност “Патологоанатомия и цитопатология” Шифър
03.01.03
на тема:**

**„Клиникоморфологични характеристики, хистотипизация и
корелацията им с някои молекулярни маркери при кожен
меланом”**

**на д-р Ина Георгиева Кобакова
докторант на самостоятелна подготовка
към Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и
деонтология,**

Факултет „Медицина” при Медицински университет – Варна

Научен ръководител: доц. д-р Екатерина Софтова, д. м.

Научен консултант: доц. д-р Петър Генов, д. м.

Със заповед N: P-109-385 / 09.11.2017 г. на Ректора на МУ Варна съм избран за член на научното жури и съответно със заповед N: P-109-414 / 30.11.2017 г. съм определен за официален рецензент по процедурата за придобиване на образователната и научна степен „доктор” с кандидат д-р Ина Георгиева Кобакова.

Актуалност и значимост на темата:

Дисертационният труд на д-р Ина Георгиева Кобакова разглежда проблема за морфологичната диагностика на един от енигматичните тумори в човешката и животинската патология – малигнения меланом. Това е тумор с много лица, показващ изключително разнообразие по отношение локализация, клинично протичане и прогноза. Проявите на регресия, както и късните рецидиви и метастази, понякога след десетилетия, поставят на дневен ред изследването на ролята на имунната система във възникването, протичането и метастазирането на меланома. Нарастването на честотата на меланома показва твърде големи различия между отделните региони и групи население. Обобщаващите проучвания на честотата на меланома в нашата страна и конкретно във Варненския регион са недостатъчни.

В диагностично-лечебния екип патологът има централно място, защото от прецизността на морфологичната диагноза до голяма степен зависи успехът от лечението. Чрез използването на имунохистохимични маркери

на диференциацията и прогресията на меланома, днес патологът може не само да прецизира морфологичната диагноза, но и до голяма степен да прогнозира биологичното поведение на тумора. Последното е основа за провеждане наред с конвенционалната и на персонализирана таргетна терапия. В това отношение, обаче, все още има редица неясноти и противоречия. Няма общоприет алгоритъм за провеждане на диагностичния процес. Всичко това прави проблема актуален и значим за клиничната практика.

Структура на дисертационния труд:

Дисертационният труд на д-р Кобакова е оформен според изискванията на 164 страници и е онагледен с 36 таблици и 49 цветни фигури. Дисертацията е добре балансирана и включва съдържание (3 стр.), използвани съкращения (1 стр.), въведение (2 стр.), литературен обзор (47 стр.), цел и задачи (1 стр.), материал и методи (10 стр.), собствени резултати и обсъждане (62 стр.), изводи и приноси (4 стр.), литература (30 стр.) и списък на публикациите (2 стр.).

Библиографията съдържа общо 240 източника, от които 7 на кирилица и останалите на латиница. От тях 33 % са публикувани през последните 5 години, а общо 58 % през последните 10 години. Авторефератът е с обем 46 стр. в него са включени 20 фигури и 10 таблици. Той е добре илюстриран и отразява съдържанието на дисертационния труд.

Литературен обзор:

Литературният обзор е структуриран в 12 глави и показва много добра осведоменост на авторката по проблема. Подробно са разгледани епидемиологията, морфологичните особености и клинично-анатомичните форми на кожния меланом. Особено внимание е отделено на некрозите, митотичната активност и улцерациите като предиктивни фактори. Интерес представляват данните за ролята на E-cadherin и N-cadherin за прехода от радиален към вертикален растеж. Проблем от изключителна важност, който може да бъде обект на по-нататъшни проучвания.

Отделна глава е посветена на регресията на меланома. Представени са стадите, през които преминава тя, както и ролята на тумор инфилтриращите лимфоцити (ТИЛ), като проява на имунна защита на организма спрямо туморния процес. Заслужава да се отбележи също, че авторката обръща специално внимание на туморната ангиогенеза и ролята ѝ за прогресията и метастазирането на меланома. В това отношение имунохистохимичното определяне на експресията на анти – VEGF (съдовия ендотелен растежен фактор) има практическа стойност с оглед възможностите за прилагане на инхибираща терапия. Подробно са разгледани маркерите за прогресия на кожния меланом. Детайлно е представена възможността за използването на трансмембрания рецептор

CD117 като маркер за детекция на c-KIT мутация и за прогресия на кожния меланом. В главата „Молекулярна патология на кожния меланом” са посочени трите най-чести групи мутации при малигнен меланом – мутации засягащи гените контролиращи клетъчния цикъл, активиращите сигналните пътища на растежа и мутации активиращи теломеразата. От мутациите активиращи сигналния път на растежа вниманието е акцентирано върху ролята и възможностите за детекция на една от най-честите мутации, тази на протоонкогена BRAF, наблюдавана в около половината от кожните меланоми. Съпоставени са възможностите за детекция на тази мутация чрез PCR (полимеразно верижна реакция) и имунохистохимично с анти-BRAF антитяло.

В заключението на обзора д-р Кобакова обосновава изтъква неизяснените въпроси и противоречията в разглежданата тема. Това ѝ дава основание да очертае проблемния кръг в настоящия дисертационен труд, а именно, проучване на заболяемостта и смъртността от кожен меланом, както и определяне на мястото на различните морфологични, молекулярни и имунохистохимични методи в диагностиката и в предикцията на биологичното поведение на малигнения меланом.

Цел и задачи:

Д-р Кобакова формулира основната цел на научната разработка като логично продължение на направения литературен обзор, а именно „да се проучат заболяемостта и смъртността от кожен меланом общо за България и конкретно за Варненска област, както и да се анализират и съпоставят клинични, хистологични, имунохистохимични и молекулярни характеристики на заболяването с оглед изясняване биологията на тумора и съставяне на примерен диагностичен алгоритъм.”

За постигането на тази цел са поставени 9 задачи, които уточняват пътищата за реализирането ѝ. Те са правилно формулирани и изпълними.

Материал и методи:

Изследваният материал е достатъчен за постигане на целта и изпълнение на поставените задачи. Той включва три групи. От които първата представлява ретроспективен анализ на стандартизираната заболяемост и смъртност от малигнен меланом за страната за период от 34 години въз основа на данни от ежегодните издания на Националната болница по онкология – София. Втората включва 452 пациенти с кожен меланом регистрирани за 10 години (2007 – 2016) в базата данни на СБАЛОЗ „Д-р Марко Марков” – Варна, за които също са анализирани показателите заболяемост и смъртност.

Третата група включва 50 болни с кожен меланом диагностицирани в Клиниката по обща и клинична патология при МБАЛ „Света Марина” – Варна и в Отделението по патология на СБАЛОЗ „Д-р Марко Марков” –

Варна. На всички случаи от тази група е извършено повторно хистологично изследване с отчитане на редица показатели като хистологичен субтип, некроза, улцерация, митотична активност и дебелина на лезията по Breslow. Освен това полуколичествено с приложение на анти-CD3 антители е отчитана лимфоцитна инфилтрация в лезиите. Имунохистохимичното изследване в тази група включва панел от пет антители анти-BRAF, анти-CD117, анти-CD3, анти-HMB45 и анти-VEGF. Резултатите са отчитани полуколичествено по четиристепенна скала въз основа на изследване на 10 полета при увеличение 400 пъти. В 27 от случаите е изследван молекулярния профил на тумора с ДНК изолирана от туморен материал включен в парафинови блокчета. Тестването е осъществено чрез алел-специфична полимеразно верижна реакция – Real time PCR. Използван е AmoyDx® BRAF V600 E/K/R/D кит с апаратура Cobas® 4800.

За интерпретация на данните е проведен статистически анализ с използване на програма IBM, SPSS v. 23. Резултатите са представени таблично чрез програма Microsoft Excel v. 2010. Приложени са адекватни статистически методи включващи дескриптивни методи, непараметричен и параметричен анализ, мултифакторен регресионен анализ и t-тест анализ.

Резултати и обсъждане:

Разделът „Резултати и обсъждане” е представен в 9 глави. Висока оценка заслужава адекватното структуриране, логическата последователност и обвързаност на отделните глави и умението на дисертантката да интерпретира получените резултати. Има пълно съответствие между поставените цел и задачи и тяхното изпълнение.

Най-съществените резултати могат да бъдат резюмирани по следният начин:

Проучена и анализирана е стандартизираната заболеваемост и смъртност от кожен меланом по отделно за страната и за Варненска област за значителни периоди от време, при което се установява тенденция за нарастване и на двата показателя.

Системно са проучени основните клиничко-анатомични и морфологични характеристики на малигнения меланом на кожата. Тук обаче, трябва да се отбележи, че установеното разпределение на меланома по локализация, както и относителните дялове на отделните клиничко-морфологични субтипове на меланома се отнася само за настоящата извадка от 50 изследвани случая. Тя е твърде малка за да се правят по нея генерални заключения.

За отбелязване е фактът, че 10 (20 %) от изследваните меланоми са с неизвестна първична локализация (unknown primary). В по-старите литературни източници този дял е около 4 – 5 %, а през последните години, при изследване на големи масиви от малигнени меланоми, още по-

малък – 1,9% (Savoia, P. et al. *Melanoma Res.* 2010, 20,3:227 – 32) и 2,6 % (de Waal, D. C. et al. *EJC.* 2012, 49,3:676 – 683) от всички меланоми. Тази група заслужава специално внимание, още повече, че при молекулярното изследване в нея се установява най-висок процент (25,9 %) на BRAF мутация в сравнение с всички други клиничко-морфологични субтипове.

Заслужава да се отбележи като достойнство на работата, че митотичната активност е определяна по метода „hot spot”, т.е. в полето с най-висока митотична активност, което е с много по-висока предиктивна стойност, от обичайно определяната средна стойност на 10 последователни зрителни полета. Висока практическа стойност има и имунохистохимичното определяне със CD3 на тумор-инфилтриращите лимфоцити като се отчита не само интензивността на лимфоцитната реакция, но и нейната локализация.

На повече от половината от случаите е извършено молекулярно изследване за BRAF мутации, като такава е установена в 70 % от тях. Интересен факт е, че при изследваните 3 случая с акрален меланом, за който е известно, че има агресивно протичане, при BRAF молекулярното изследване мутация се установява само при един от тях. Получените резултати са послужили за сравнение с редица други морфологичните показатели, като е търсена кръстосана зависимост.

На всички изследвани тумори от трета група е проведено имунохистохимично изследване с умело подбран панел от антитела. Резултатите са много добре илюстрирани с микроскопски снимки и представени като таблици и диаграми. Убедително е показана възможността за използване на анти-VEGF и анти-CD117 антителата като предиктивни маркери като същевременно авторката е предпазлива в своите заключения и изтъква необходимостта от допълнителни проучвания.

Търсени са и са открити интересни кростабулационни зависимости между молекулярно установените BRAF мутации и възрастта на пациентите и клиничко морфологичния субтип на меланом.

Специално внимание заслужава главата (5.5) в която се съпоставят резултатите от молекулярното изследване на BRAF мутацията и експресията на анти- BRAF антитяло. Доказва се възможността за използване на последното при недостатъчно количество туморна ДНК за молекулярно изследване, както и като скрининг и първа стъпка при оценка на BRAF статуса на пациентите с меланом.

В поредица от таблици и диаграми е представена убедително кростабулационната зависимост между BRAF статуса и редица други морфологични белези като дебелина на лезията по Breslow, митотична активност, некрози и улцерации.

Чрез използване на мултифакторен регресионен анализ е изследвана причинната зависимост между BRAF статуса и клиничко-анатомичните и морфологични показатели. Създадени са два регресионни мултифакторни

модела. Първият, от тях показва влиянието на ТИЛ, некрозите, улцерациите и броя митози спрямо експресията на анти- BRAF антитяло. Вторият модел отчита влиянието на клинично-анатомичния субтип, пола и възрастта спрямо експресията на анти- BRAF антитяло. Тези модели, както и авторката сама изтъква, подлежат на допълнителни по-разширени проучвания, които да потвърдят тяхната валидност преди приложението им в практиката.

Д-р Кобакова установява обратно пропорционална корелационна зависимост между експресията на анти- BRAF антитяло и на анти-CD117 антитяло. От тук следва възможността анти-CD117 антитялото да се използва като предиктор за BRAF мутационния статус. Поради взаимното изключване на BRAF V660E мутацията и с-KIT мутацията, това антитяло, според авторката, може да се използва и за предикция на с-KIT мутационния статус. Естествено тези предложения е необходимо да бъдат потвърдени и от други подобни изследвания.

Последната глава (5.9) е изцяло с практическа насоченост. Представен е списък на задължителните за оценка на меланома клинични, макроскопски, хистологични и имунохистохимични показатели и изследвания необходими за диагностична и прогностична оценка на меланома. Повечето от тях са добре известни, но за съжаление не се използват в пълен размер в ежедневната клинична практика.

Въз основа на резултатите от собствените изследвания и литературните данни д-р Кобакова предлага диагностично-прогностичен алгоритъм за определяне на поведението при кожен меланом. Същият позволява в зависимост от клинично-морфологичния субтип, пола и наличието на вертикален туморен растеж определен по скалата на Breslow да се определи необходимостта от изследване на анти-BRAF и анти-CD117 антитела, както и молекулярно тестване за BRAF мутация. Авторката изтъква, че предложеният алгоритъм е примерен и е отворен за допълнения в резултат на проучвания върху по-голям брой случаи. Последното несъмнено е пример за отговорно и критично отношение към собствените резултати, рядко наблюдаван феномен заслужаващ адмирация.

Изводи:

Изводите отговарят на поставената цел и задачи. Добре са формулирани и логично изведени от получените резултати.

Приноси:

Приемам оригиналните, потвърдителните и научно-приложните приноси, така, както са представени. Считаю, че предложените за първи път у нас два мултифакторни регресионни модела, както и предложеният примерен диагностичен алгоритъм след адекватно тестване могат да намерят място в практиката.

Критични бележки:

Първата част на литературният обзор има отчасти пропедевтичен характер, това обаче, до голяма степен е оправдано, с оглед наличието на разнообразни форми на тумора, които се интерпретират в сравнителен аспект в резултатите и обсъждането.

Публикации и научни съобщения във връзка с дисертационния труд:

Във връзка с дисертационния труд д-р Кобакова представя 4 пълнотекстови публикации в български списания и три участия в научни форуми. Научната активност е достатъчна според изискванията, но считам, че дисертантката има потенциал и материал по темата, който позволява по-голям брой публикации и съобщения на научни форуми.


Заключение:

Дисертационният труд на д-р Ина Георгиева Кобакова третира актуален проблем от туморната патология и е резултат на добре планирано и задълбочено проучване. Оригинален е и отлично онагледен. Той е нейно лично дело и демонстрира много добра литературна осведоменост. Приложени са адекватни съвременни методи на изследване и на статистическа обработка на резултатите. Направени са оригинални приноси с научно и практическо значение. Авторката е критична към получените резултати и същевременно прави заявка за по-нататъшно изследване на по-голям материал с разширяване на панела за имунохистохимичното изследване и с включване на допълнителни предиктивни маркери.

Дисертационният труд отговаря на напълно изискванията за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“. Това ми дава основание с убеденост да предложа на уважаемото научно жури да гласува положително за присъждане на образователната и научната степен „Доктор“ на д-р Ина Георгиева Кобакова.

31 януари 2018 г. Рецензент:

Варна


проф. д-р Ангел Атанасов Ангелов, д. м. н.