

РЕЦЕНЗИЯ

върху процедура за придобиване на ОНС „доктор” по докторска програма
„Клинична хематология” с тема на дисертационния труд :

***КОРЕЛАЦИОННА ЗАВИСИМОСТ МЕЖДУ ТУМОРНАТА
АНГИОГЕНЕЗА, МУТАЦИОННИЯ ТОВАР, ПРОМЕНИТЕ В
КРЪВНАТА КАРТИНА И ТРОМБОГЕННИЯ РИСК ПРИ ПАЦИЕНТИ
С ЕСЕНЦИАЛНА ТРОМБОЦИТЕМИЯ И ПОЛИЦИТЕМИЯ ВЕРА***

С автор д-р **Антонио Иванов Антонов**,

докторант в самостоятелна форма на подготовка в

Научен ръководител: Доц. д-р Лиана Герчева-Кючукова, д.м.

От проф д-р Стефан Е. Горанов, дмн;

Ръководител Секция Хематология към МФ на МУ-Пловдив

4000 Пловдив; бул „Васил Априлов” №15А тел 032/602-596

На основание заповед на Ректора на МУ - Варна № Р-109-199 от 23.05.2018 г за отчисление с право на защита и назначението ми със същата заповед като член на Научното жури ми бяха предоставени документите и дисертационния труд по процедура в област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление: 7.1. Медицина и специалност „ Хематология и преливане на кръв“. Етапите на докторантурата са спазени, няма промяна на първоначалната тема и научния ръководител, и отговарят на нормативните уредби на МУ Варна и ЗНСЗ.

Кратки биографични данни: Д-р Антонов е плевенски възпитаник, където завършва средно и висше образование по медицина. След дипломирането си през 1990 г започва работа като общопрактикуващ лекар и специализация по вътрешни болести. От 1996 до 2012 г е асистент, ст. асистент в Клиниката по хематология на МУ Плевен, а от 2012 г е сред академичния кадър на едноименната клиника в МУ

Варна. Д-р Антонов има две специалности – по вътрешни болести (1998) и клинична хематология (2001). В момента на докторантурата д-р Антонов има 25 г трудов стаж, от които 18 по специалността и също толкова като асистент, ангажиран с учебно-преподавателска дейност. Владее английски и руски езици.

Актуалност на темата

Хроничните Ph(-) миелопролиферативни неоплазии (ХМПН) се превърнаха в необятна научна ниша, не само с установените вече генетичните нарушения в тирозинкиназните гени JAK2^{V617F}, MPL, CALR, с проучваните още 20 други аномалии, но и с възможната им съкорелация с отдавна установени критични клинични симптоми и честа причина за леталния изход. Нивото на тромбоцитния брой, техните функции, реологичните проблеми, промените в еритроцитните мембрани, левкоцитозата с протеолитичните ензими, ангиогенезата, алелния товар и вродената тромбофилия (ВТ) са сред основните показатели за повишените тромботични събития (ТС) при горните заболявания. Клиничната практика отдавна е доказала, че се оформя определен прокоагулантен фенотип, който води до тромботични инциденти при всеки пети пациент още до момента на диагностицирането на процеса. От друга страна ПВ и ТЕ са заболявания с реална възможност за увеличаваща се преживяемост. Това определено поставя в дефицит утвърдените твърде скромни фактори за оценка на тромботичния риск при ХМПН: възраст, наличието на сърдечно – мозъчна патология или анамнеза за такава. Патогенетичните взаимодействия на горните вродени или придобити фактори в костно-мозъчния компартимент представяват темата на дисертационния труд като *актуален, дискутабилен и недостатъчно проучен проблем при Ph(-) ХМН и с дълг към изискванията на съвременната клинична хематология*

Структура на дисертационния труд

Дисертационния труд е написан на 117 стандартни страници и е онагледен с 40 таблици и 26 фигури. Включени са 2 приложения. Ползваните заемки от цветни фигури и фотоси са с цитирана принадлежност на съответен автор. Научният труд

е структуриран в 8- те стандартни раздели, в приемливо съотношение между тях. Библиографията включва 164 литературни източника, от които 5 на кирилица и 129 на латиница, като повечето са от последните 10 години.

Литературен обзор.

Той е в обем 31 стр, онагледен с 12 фигури и 7 таблици. В него проличава теоретичната осведоменост на автора, резултат от дългогодишна научна насоченост върху ангиогенезата, тромбогенния риск, мутационния товар при хроничните Ph(-) миелопролиферативни заболявания. Основните акценти в литературния обзор са патогенетичните механизми и вероятните рискови фактори като вродената тромбофилна диатеза, мутационния товар от JAK2^{V617F} и костномозъчната ангиогенеза за изявата на ТС и значението на последните в прогностичен аспект. От използваните литературни данни авторът очертава един малко разботван проблем не само с подчертания дефицит в националната литература, а преди всичко с нееднозначността на цитираните резултати и тяхната интерпретация в международните източници. Един факт обаче е общоприет - най-честата причина за усложнения и повишена смъртност при ЕТ и ПВ са тромботичните събития (ТС). Изложението на литературните данни е с научно-издържана безпристрастност и стил, без излишно теоретизиране и без императивни и съмнителни съждения. Структурирането на литературния обзор отговаря на темата на дисертационния труд. Става ясно, че в ерата на уточнените мутациите в тирозинкиназните гени те не само са безалтернативен диагностичен критерий, а научна ниша за изследвания на техните разнообразни взаимоотношения в костномозъчния компартимент. Така необходимостта от проучвания по дискутирания проблем е логичния завършек на обзора.

Приемам литературния обзор като адекватен на разработваната тема.

Работна хипотеза. Цел и задачи.

На базата на литературни обзор работната хипотеза е правилно структурирана, като е изградена върху задълбочения анализ на достъпната до момента литература.

Цел и задачи на дисертационния труд

Целта е формулирана конкретно и ясно. Бих избягнал думите „някои достъпни показатели“ , създаващи лека неопределеност и бих подменил с „основни показатели“, които са над 20 на брой и с които на практика е осъществена научната работа. Задачите са 7 и ешалонират проучването „стъпка по стъпка“ в взаимоотношения на един мултифакторен процес за изявата и развитието на ТС със съвременни патогенетични маркери: алелен товар, стандартните хематологични показатели и по-специално на левкоцитния брой в момента на диагностицирането на заболяването, носителство на фактори за вродена тромбофилия, костномозъчната ангиогенеза, спленомегалията.

Приемам така формулираните цел и задачи, включващи показатели, въз основа на които е напълно възможно получаването на резултати, дискусията по тях и оформянето на изводи по темата на дисертационния труд.

Методология на дисертационния труд.

Методологичната основа на всеки дисертационен труд е в състояние да „торпилира“ всяка добра научна идея и обратно. Д-р Антонов се е справил професионално с пациентската група и подбора на методите. Методологичният панел е твърде разнообразен : класически клиничко-биохимични показатели, костномозъчни биопсии, хистология от двама специалисти, имунохистохимия и молекулярна-генетика. Всички методи, вкл. с проколите, са описано подробно с необходимата последователност, съответна на етапите на проучването и съгласно изискванията на дисертационна работа. В дисертационния труд са включени събираните проспективно и ретроспективно данни от 199 пациента с ЕТ и ПВ от университетски клиники по хематология на УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ - Плевен , УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна и съответните диагностични звена по Обща и клинична патология, Клинична имунология, Медицинска генетика и Биохимия.

Периодът на проучването е от 2005 до 2017г, което е обяснимо с рядкостта на заболяванията. Пациентите са диагностицирани съгласно общоприети диагностични критерии и риск стратификации по СЗО, от които 157 ретроспективен материал и 44 проспективен, разпределени в 2 основни групи, обработени с едни и същи методи. Включени са в създадената от автора електронна база данни с подбрани и отговарящи на целите на дисертационната работа 12 подробни панели показатели. За сравняване на данните за имунохистохимичния анализ и факторите за вродена тромбофилия са обособени 2 контролни групи от 122 здрави лица с подобни демографски данни от един и същи географски район. От всеки включен в проучването пациент има подписано информирано съгласие. Използван е статистически панел на SPSS 19 (SPSS Inc Chicago, Illinois) с богат набор от статистически методи с конкретно поставени групи въпроси при анализа.

Резултати.

Получените резултати от дисертационния труд са групирани в раздели, съответстващи по последователност на поставените задачи. Приложените таблици и фигури са без дублиране на информацията. Резултатите от конвенционалните и генетични изследвания са представени по нозологии, а за патогенетичното значение на вродената тромбофилия - общо за двете заболявания, което като подход по принцип приемам. Но така авторът е попаднал в капана на малките по брой на пациентски групи, което ограничава възможностите на статистическите методи. Имам забележка и за мястото на фигурите, посочващи разпределението по пол и възраст, което е характеристика на пациентите и трябва да бъдат в раздела „Пациенти и методи“.

Първоначалният анализ показва, че повече от половината болни с ТЕ и ПВ са високорискови. При 11% от болните с ЕТ са установени ТС по-чести при жените, като при женския пол с ПВ нарастват успоредно напредването на възрастта. От получените резултати и анализа е видно, че не се установява сигнификантна разлика в честотата на регистрираните 46 ТС при пациенти с ПВ в зависимост от

алелния товар ($JAK2^{V617F} < 50\%$ и тази с $JAK2^{V617F} \geq 50\%$). Установява се тенденция за по-висока честота на единично ТС при жените и двойно ТС при мъжете в зависимост от мутационния дефект. Степента на алелния товар на JAK^{V617F} , корелира със степента на спленомегалия ($p < 0,03$), което съответства и на литературните данни. В групата с масивна спленомегалия хомозиготно носителство се установява в 62,5%, а при хетерозиготите - в 25%. Авторът намира значима разлика в честота на спленомегалията, която при wild type е 36%, а при $JAK2^{V617F} \geq 50\%$ - 75%. при ПВ. Степента на спленомегалията обаче не влияе върху честотата на ТС. При пациенти ЕТ резултатите са аналогични: при $JAK2^{V617F} \geq 50\%$ всички пациенти (100%) са със спленомегалия. Данните за корелацията между левкоцитния брой и ТС показват, че при ЕТ липсва самостоятелна корелация между левкоцитния брой и ТС, но е установена по-висока честота на ТС при повишен левкоцитен брой и наличие на $JAK2^{V617F}$ (Anova $p=0.004$). При ПВ корелационната зависимост е значима при наличието на левкоцитоза и спленомегалия (Anova $p=0.024$).

Интересни и даващи възможност за широка дискусия са резултатите за влиянието на показателите за вродена тромбофилия върху честота на ТС и ПВ и ТЕ. Заслужава внимание установената силна корелация за P1A2/GPIIIa и FVLeiden и честотата на ТС. Мутацията PR G20210A е 3 пъти по-честа при пациенти с ТС в сравнение с контролите. Двойното носителство е 5 пъти по-често при ЕТ и 8 пъти при ПВ с ТС. Авторът не установява влияние на мутацията MTHFR C677T върху ТС, освен в комбинация с P1A2/GPIIIa. Еднопосочните резултати показват, че факторите за вродена тромбофилия са рискови за ТС при изследваните пациенти с ПВ и ТЕ.

По отношение на ангиогенезата е установена статистически значима връзка между нейната степен, $Jak2^{V617F}$ мутационния товар $\geq 50\%$ ($p=0,001$) и размера на слезката ($p=0,0001$); между броя на ТС и микросъдовата плътност ($p=0,028$).

Последните резултати от група 7 показват също липсата на корелация между ТС при двете нозологични единици и стандартните хематологични показатели

Съвсем логично и задължително е да се направи опит сред толкова положителни корелации между най-разнообразни молекулярни, патолого-анатомични и рутинни показатели за двете заболявания да се намери **прогностично независимият** или този , който може да моделира самостоятелно изявата, еволюцията и прогнозата на ТС. Авторът не посочва такъв на базата на получените резултати и използвания статистическия анализ, което съвсем коректно е отбелязано в заключение.

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

Дискусия.

Дискусията е основен раздел със съответните изисквания за всеки дисертационен труд. Като се има предвид литературния обзор, теоретичното богатство на обясненията на резултатите и наличието или не на значима корелационна зависимост, вече не е изненада. Всички резултати са коментирани в патогенетичен аспект на базата на съвременните познания и аналогични проучвания в медицинската литература. Стилът на дискусията е увлекателен и убедителен. Става ясно, че липсата на корелация между алелния товар и честота на ТС , което отхвърля работната хипотеза, е посочено и от автори в големи за двете нозологии серии от пациенти. Авторът обяснява това с различното клетъчно разпределение на мутиралите алели при еднаква степен на мутационния товар. Левкоцитозата по данни на автора няма самостоятелно значение като рисков фактор за ТС, но подпомага ефекта на Jak2^{V617F} мутацията, като изявява различен фенотип и при двете болести.

Резултатите от проучването влиянието на факторите за вродена тромбофилия са богато дискутирани. Установената по-висока честота на факторите на вродената тромбофилия при ТС се различават от други 2 проучвания. Според автора случаите с носителство на повече от един маркер за вродена тромбофилия (т.н. двойно носителство) са с по-висока честота при ПВ и ЕТ (14.28%) в

сравнение със здравите контроли (4.46%). Най-често е съчетанието между P1A2/GPIIIa и MTHFR C677T, което има адитивен ефект за тромботичен риск. В достъпната литература значението на полиморфизмът P1A2/GPIIIa в съчетание с мутационния товар за увеличаване на адхезията и агрегацията на тромбоцитите, респективно тромбогенния риск, липсват данни. Дискусията на раздела за ВТ приключва с общоприети препоръки за изследване на факторите от 2017 г, които авторът потвърждава на практика. За установената силна корелационна зависимост между увеличената костно-мозъчната ангиогенеза и степента на спеномегалия, описана и от други автори, липсват обяснения в литературата. Според д-р Антонов екстремедуларната хемопоеза е компенсаторна „резервоарна“ реакция на фона на общ процес на прогресираща съдово-ендотелна болест.

Богатството на дискусията обаче е един задълбочен съвременен анализ на тромботичния процес в здрави лица и пациенти с ЕТ и ПВ, което по принцип трябва да е в литературния обзор и дори леко се отдалечава от тематиката. Приемам обаче тази част от дискусията като изключително актуален интердисциплинарен проблем върху етиопатогенетичните, компенсаторните и регулаторни механизми на ТС и дори бъдещите терапевтични таргети. На базата на собствените проучвания и литературните данни авторът стига до логичния извод, че причините за ТС при ПВ и ТЕ, които са каузалния фактор за усложнения и летален изход, трябва да се търсят извън постулата на Вирхов чрез нов методологичен подход за тяхната оценка (напр. внедряването на новите доплер-ехограски методики за кръвотока при пациентите с ПВ и ЕТ), или изработване на диференцирани артериални и венозни тромботични модели за всяко от двете заболявания.

Изводи

Авторът не е допуснал смесването на резултати и изводи. Изводите на научния труд са строго базирани на получените данни и отговарят на поставените цел и задачи. Приемам и 9 –те на брой, като добре формулирани в научен стил:

1. Мутационният товар на $Jak2^{V617F}$, изследван чрез RT-PCR не влияе на честотата на ТС при ПВ, независимо от литературните данни при провежданите експериментални проучвания. При ЕТ наличието на мутация $Jak2^{V617F}$ води до несигнификантно нарастване на тромбозите.

2. Левкоцитният брой, установен при поставяне на диагнозата, няма прогностично значение за развитието на тромботични събития.

3. Факторите за вродена тромбофилия значимо увеличават риска за ТС. Носителството на поне един генетичен дефект увеличава около 4 пъти тромбогенния риск при пациентите с ЕТ и ПВ, в сравнение с лицата, при което такова не е установено. Двойното носителство е по-често срещано при пациенти с тромботични събития, спрямо контролите и е свързано с нарастване на риска от тромбоза до 7 пъти.

4. Костно-мозъчната ангиогенеза при пациентите с ПВ и ЕТ корелира с мутационния товар и спленомегалията, но не корелира с честотата на тромботичните събития.

5. Липсата на корелация между мутационния товар на $Jak2^{V617F}$, левкоцитозата и честотата на тромботични събития при пациентите с ПВ не позволява включването на посочените показатели в разширен прогностичен панел.

6. Патологичните промени, установени при стандартните хематологични изследвания са статичен показател, който не отразява динамиката в съдовата система и нямат сигнификантно влияние върху тромботичния процес.

7. Тромботичният процес при двете заболявания може да се развие по различни механизми. Необходимо е въвеждането на функционална оценка на кръвотока в рационално избрани критични области за поява на тромбози.

8. Удачно е съставянето на многокомпонентни прогностични модели, включващи представители на всеки елемент от триадата на Вирхов, включително функционална оценка на съдовата система, които да бъдат апробирани в клиничната практика.

9. Поради различните условия за тромбогенеза е необходимо създаването на тромбогенни индекси, различни не само за двете заболявания, но и за различните отдели на съдовата система (артериална и венозна).

Приложенията представляват авторското виждане за прецизиран подход за изследване на пациенти с ЕТ и ПВ за носителство на вродена тромбофилия (приложение 1) и анкетна карта за търсене на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с МПН (приложение 2). И двете приложения имат определено практическо значение.

Приноси на дисертационния труд

Приемам авторската самооценка за приносите на дисертационния труд , оформени в 3 групи. Употреба на съчетанието „ за първи път” не дразни , защото това не с

обичайните за млади автори суперлативи, а действителен реален факт. Трябва да се подчертае, че научните и научно-приложни приноси на д-р Антонов се отнасят към категорията „получаване и доказване на нови факти“, което прави дисертацията още по-ценна. Приемам и предложения автореферат, който отговаря на изискванията.

Заключение.

Научните разработки за корелационните зависимости между мутационния товар, факторите на вродената тромбофилия, ангиогенезата и тромбогенния риск при ПВ и ТЕ са истинско предизвикателство в уточняване на патогенезата на един многофакторен, съкорелиран и съподчинен процес. С професионално избраната и много добре изпълнена методологично работа, която обогатява теоретичните представи по проблема, дисертационния труд отговаря на критериите за подобна научна работа и съвременните изисквания на клиничната хематология.

На основание на всичко гореизложено, както и изрядността на приложената документация, съгласно Правилника на МУ Варна, убедено препоръчвам на Научното жури да гласува положително и присъди по достойнство образователната и научна степен «доктор» на д-р Антонио Иванов Антонов.

.....
Проф д-р Стефан Горанов, д.м.н.

20.06.2018 /Пловдив