

РЕЦЕНЗИЯ

от Проф. д-р Георги Константинов Чернев на
дисертационен труд на тема „Клинико-морфологични характеристики,
хистотипизация и корелацията им с някои молекулярни маркери при кожен
меланом”

от д-р Ина Георгиева Кобакова , докторант от клиника по патология при МУ-
Варна

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”

Дисертационният труд е представен в 164 страници, които са разпределени както следва: съдържание и съкращения –6 стр., въведение –2 стр., литературен обзор – 45 стр., заключение (обзор)- 2 стр., цел и задачи са на 1 стр., материал и методи –10 стр. „Резултати и обсъждане”–60 стр. Изводите са представени на 2 стр., приносите на дисертационния труд- също на 2 стр., собствените публикации и участия във форуми –на 2 стр. , като референциите обхващат 29 нестандартни машинописни страници. Книгописът съдържа 240 актуални заглавия, от които 7 на кирилица и 233 –на латиница, подбрани от последните 15 години и съобразени с най-новите схващания относно патогенезата, епидемиологията и прогресията на меланом.

Тематиката на дисертационния труд е посветена на един изключително важен раздел в дерматоонкологията- меланом на кожата. Корелационните анализи между туморната дебелина, експресията на определени молекулярни маркери и прогнозата на пациентите са в основата на дерматоонкологичната наука, те са двигателя на медицинската мисъл и на последвалото клинично поведение или таргетна терапия. Познаването на основните имунохистохимични техники (PAP, APAP) за детекция на молекулярни маркери или протеини, характерни за меланомната тъкан, е от ключово значение за последвалите анализи и би следвало да бъде подбрано много точно. Българската дерматонкологична школа е една от първите, които участват в колаборация с немската дерматологична школа в подобен род изследвания.

Литературният обзор е като цяло добре структуриран и в първата си част обхваща епидемиологичните данни за меланома, съобразени със съответните географски ширини, както и данни за заболяемостта в България. Споменати са точни данни и за морталитета в България, Европа и Америка. Дискутира се ролята на различни ендогенни и екзогенни фактори, касаещи пряко или косвено манифестацията на заболяването. Детайлно се дискутират рисковите групи като ВК Mole синдрома и FAMMM syndrome. Липсват обаче допълнителни важни ключови групи (от пациенти, застрашени от развитието на меланом) като евентуални рискови фактори за меланомната прогресия- пациенти с гигантски конгенитални меланоцитни невуси, със средно големи меланоцитни невуси и дребни атипични конгенитални невуси, обозначавани още като малки атипични конгенитални меланоцитни невуси или псевдомеланоми. Ролята на бременността като рисков фактор липсва като база литературни данни и дискусия в секцията въведение. Тези данни би следвало или е желателно да се допълнят и дискутират в текста и да са съпроводени със съответните цитати или липсващите напълно до момента българските приноси, следват цитати:

- 1.Tchernev G, Lozev I, Pidakev I, Lotti T, Wollina U, Gianfaldoni S, Lotti J, França K, Batashki A, Maximov GK, Chokoeva A. Giant Congenital Melanocytic Nevus GCMN) - A New Hope for Targeted Therapy? Open Access Maced J Med Sci. 2017 Jul 22;5(4):549-550. doi: 10.3889/oamjms.2017.121. eCollection 2017 Jul 25.
- 2.Tchernev G, Patterson JW, Bakardzhiev I, Lotti T, Lotti J, França K, Batashki A, Wollina U.Late Onset Achromatic Melanoma Arising in a Giant Congenital Melanocytic Nevus. Open Access Maced J Med Sci. 2017 Jul 18;5(4):533-534. doi: 10.3889/oamjms.2017.077. eCollection 2017 Jul 25.
3. Chokoeva AA, Fioranelli M, Roccia MG, Lotti T, Wollina U, Tchernev G.Giant congenital melanocytic nevus in a bulgarian newborn. J Biol Regul Homeost Agents. 2016 Apr-Jun;30(2 Suppl 2):57-60.
4. Goldman A, Wollina U, Tchernev G, Chokoeva AA, Lotti T.Medium-sized congenital melanocytic nevus of the forehead, glabella and temple surgical treatment and long-term follow-up. J Biol Regul Homeost Agents. 2016 Apr-Jun;30(2 Suppl 2):53-8.
5. Chokoeva A, Tchernev G.[Significance of the clinical and dermatoscopic findings, histopathology and reflex confocal microscopy (RCM) in determining the origin of melanocytic lesions: an analysis based on a clinical case]. Akush Ginekol (Sofia). 2014;53(6):56-62. Bulgarian.

6. Trayanov I, Trayanova E, Chokoeva A, Tchernev G.[CONGENITAL MELANOCYTIC NEVUS OF THE SHOULDER WITH RAPID GROWTH PROGRESSION DURING PREGNANCY. SUCCESSFUL SURGICAL APPROACH]. Akush Ginekol (Sofia). 2015;54(8):51-6. Bulgarian.

7. Trayanova E, Chokoeva AA, Tchernev G, Patterson JW, Wollina U, Lotti T.Dysplastic nevi, melanoma and pregnancy- where is the relationship? J Biol Regul Homeost Agents. 2015 Jan-Mar;29(1 Suppl):87-90.

8. Tchernev G, Ananiev J, Cardoso JC, Chokoeva AA, Philipov S, Penev PK, Lotti T, Wollina U.Multiple primary cutaneous melanomas in patients with FAMMM syndrome and sporadic atypical mole syndrome (AMS): what's worse?Wien Med Wochenschr. 2014 Aug;164(15-16):302-7.

Поради фактът, че тази информация е налична в медлайн, а българските приноси там за значителни, би било желателно поне част от гореспоменатите цитати да бъдат допълнени и дискутирани в главата въведение (увод).

Дискутират се и модерните патогенетични механизми, които включват регулацията на клетъчния цикъл, като липсват отново важни данни от участието на български колективи в тях. Озадачаваща е отново липсата на българския принос към тази тематика ? Препоръчително и/или желателно е включването на следните цитати в главата обзор- патогенеза, както и в главата молекулярна патология на меланома, които ще доведат до нейното обогатяване, както и допълване на част от липсващите данни, следват цитати 1-12 :

1 Fecker LF, Geilen CC, Tchernev G, Trefzer U, Assaf C, Kurbanov BM, Schwarz C, Daniel PT, Eberle J.Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. J Invest Dermatol. 2006 Jun;126(6):1366-71.

2. Tchernev G, Orfanos CE.Downregulation of cell cycle modulators p21, p27, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related proteins Bax and Bak in cutaneous melanoma is associated with worse patient prognosis: preliminary findings. J Cutan Pathol. 2007 Mar;34(3):247-56.

3. Tchernev G, Nenoff P. [Dissecting the pathways of tumour escape: "question of life and death?"]. *An Bras Dermatol*. 2010 Mar-Apr;85(2):248-59. Review. Portuguese.
4. Чернев Г, Орфанос К. Малигнен меланом- ролята на началната клинична находка, туморната дебелина и ранната диагностика за прогнозата. *Съвременна медицина* 2005; 56 (1):50-55.
5. Чернев Г, Орфанос К. Малигнен меланом- апоптоза и меланом. *Съвременна медицина* 2005; 56 (1):56-61.
6. Чернев Г, Гайлен К, Зубулис Хр, Орфанос К. p53- роля при регулирането на клетъчния цикъл и апоптозата при карциноми и при малигнен меланом. *Съвременна медицина* 2005; 56 (3):47-54.
7. Чернев Г, Гайлен К, Зубулис Хр, Орфанос К. Малигнен меланом- роля на клетъчните модулатори p 16, p 21, и p 27, както и на туморния супресорен протеин Rb като нови прогностични фактори. *Съвременна медицина* 2005; (56) 3:41-46.
8. Чернев Г. Прогностична значимост на протеините на BCL-2 фамилията и инхибиторите на клетъчния цикъл при злокачествен меланом на кожата в стадий 2A. Автореферат на докторски дисертационен труд. София, 2006.
9. Апостолова МД, Чернев Г. Прогностично значение на регулаторите на клетъчния цикъл p 21, p 27, p 53, Rb и на проапоптозните мултидоменни протеини Вах и Вак за канцерогенезата – критично мнение. *Медицински преглед* 2007; 43 (4):5-11.
10. Tchernev G, Ananiev J, Cardoso JC, Chokoeva AA, Philipov S, Penev PK, Lotti T, Wollina U. Multiple primary cutaneous melanomas in patients with FAMMM syndrome and sporadic atypical mole syndrome (AMS): what's worse? *Wien Med Wochenschr*. 2014 Aug;164(15-16):302-7.
11. Tchernev G, Chokoeva AA, Wollina U, Lotti T. De novo congenital malignant melanoma: what's new in diagnosis and treatment? *Dermatol Ther*. 2016 Jan-Feb;29(1):13-4.

12. Tchernev G, Chokoeva AA. Congenital 'de novo' malignant melanoma. Successful surgical approach in a Bulgarian newborn. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016 Oct;30(10):e93-e94.

Препоръчително е българските приноси към тази проблематика да бъдат цитирани в обзорната част на дисертационния труд, а резултатите от тях- кратко дискутирани. Още повече, че гореспоменатите данни са от последните години и засягат ключови моменти от патогенезата, прогнозата, а оттам и лечението на меланом.

В графата въведение авторът описва цяла подглава със заглавието форми на меланом. При описанието на акралния меланом като подформа на меланом би следвало да се добави и неговата рядка подформа- интердигитален меланом, обхващащ 2 междупръстни пространства, описан за първи път в света от български колектив:

1 Tchernev G, Lozev I, Pidakev I, Mangarov H, Grigorov Y, Cardoso JC, Popchristova E, Patterson JW, Lotti T, Pehlivanov G, Voicu C, Clatici VG, Wollina U. Interdigital melanoma simultaneously affecting two neighboring interdigital spaces : First description in the medical literature. Wien Med Wochenschr. 2017 Apr 24. doi: 10.1007/s10354-017-0558-2. [Epub ahead of print].

Препоръчително е да се дискутира накратко и в текста.

При описване на подформата метастаза от меланом с неясен примариус липсват важни български и същевременно международни приноси, описани и дискутирани в световната литература. Поради факта, че тези данни би следвало да определят един по всяка вероятност коренно различен подход при засегнатите пациенти, то би следвало или би било препоръчително тези данни да се цитират и дискутират. Следва цитат:

1. Tchernev G, Chokoeva AA, Popova LV. Primary Solitary Melanoma of the Lymphatic Nodes Or a Single Metastasis of Unknown Melanoma: Do We Need a New Staging System? Open Access Macedonian J Medical Science 2017;5 (7) 970-973.

Препоръчително е тяхното дискутиране в уводната част.

липсват и други две редки форми на меланом, който са съществен принос на българската дерматонкологична и дерматохирургична школа, цитат:

1. Damianov N, Tronnier M, Koleva N, Wollina U, Gianfaldoni S, Lotti T, Lotti J, França K, Batashki A, Mangarov H, Tchernev G. Verrucous-Keratotic Malignant Melanoma (VKMM). Open Access Maced J Med Sci. 2017 Jul 24;5(4):547-548. doi: 10.3889/oamjms.2017.142. Ecollection 2017 Jul 25.

2. Tchernev G, Chokoeva AA. Congenital 'de novo' malignant melanoma. Successful surgical approach in a Bulgarian newborn. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016 Oct;30(10):e93-e94.

Желателно е да се въведе като подформа в графата *Основни клинико-морфологични субтипове на меланом*, като заглавието се промени на *Основни клинико-морфологични субтипове на меланом, редки форми*.

Поради промяна в системата за стадиране от 2017г, би следвало авторът да се съобрази с новото стадиране на меланома и да го адаптира съобразно новите препоръки. Новото стадиране на меланома от 2017 (което не е адаптирано в докторската работа или дисертационния труд, говори индиректно за не добра информираност на докторанта и ръководителя на дисертационния труд) да бъде добавено не само като клинично стадиране, но да се добавят и отделни таблици, включващи информации за локорегионалните и далечните метастази и тяхното стадиране съгласно новите препоръки в литературата. Стадирането на меланома се извършва по различен начин към актуалния момент, цитат:

Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, Lazar AJ, Faries MB, Kirkwood JM, McArthur GA, Haydu LE, Eggermont AMM, Flaherty KT, Balch CM, Thompson JF; for members of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Expert Panel and the International Melanoma Database and Discovery Platform. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 2017 Nov;67(6):472-492. doi: 10.3322/caac.21409. Epub 2017 Oct 13.

Поради това, предложеното от докторанта стадиране е неактуално.

Коментирайки c-Kit мутациите при аноректалните и мукозалните меланоми в графата маркери за прогресия, би следвало или би било желателно да са добавят и следните липсващи цитати, които са български принос към световната литература:

Tchernev G, Semkova K, Philipov S, Gornev R, Ananiev J, Wollina U. Anorectal malignant melanoma in a hemorrhoidal nodule: a diagnostic and therapeutic problem. Wien Med Wochenschr. 2013 Nov;163(21-22):499-504.

В графата молекулярна патология на кожния меланом да бъдат цитирани гореспоменатите цитати от 1-12 с оглед по добра изчерпателност и добавяне на българските приноси в световната литература. Да се добавят към тях и следните цитати, които да бъдат дискутирани и в самия текст, цитат (1):

1. Chokoeva AA, Ananiev J, Wollina U, Tana C, Lotti T, Cardoso JC, Tchernev G. IMP-3 EXPRESSION IN BENIGN MELANOCYTIC NEVI, DYSPLASTIC NEVI AND MALIGNANT MELANOMA: PRELIMINARY FINDINGS IN BULGARIAN PATIENTS. J Biol Regul Homeost Agents. 2015 Jul-Sep;29(3):695-9.

Оценката на имунохистохимичната реакция (Отдел: материали и методи) е направена, доколкото се подразбира с методика PAP (пероксидаза анти пероксидаза?), а не с APAP (алкална фосфатаза анти алкална фосфатаза) методика. Липсват подробни данни в дисертационния труд, които 1) да обяснят, да визуализират ясно този метод (както и да обяснят кой метод е използван) и 2) да го сравнят с APAP метода, който е определено по-подходящ и приложим за евалуирането на меланоми или тумори, които съдържат кафяв пигмент. Липсват данни, които да дават обяснение кой метод е използван? Кои са предимствата и недостатъците на двата метода и защо докторантът се спира на неподходящата методика?

PAP методиката е неподходяща за отдиференциране на положителната реакция в меланомна тъкан, тъй като оцветява тъканта в кафяво, докато APAP методиката оцветява в червен цвят съответните тъкани и структури, което води до ясно отдиференциране между желаните за детектиране маркери и меланомната тъкан (кафява на цвят по правило). Би следвало методиката да се преработи изцяло или

отново. Липсват и подробни фотоданни за оцветените тъкани и тяхната оценка, което е задължително при трудове с евалуация на срезите с горепосочените методики. На направените единични снимки с номера 27,29,31,33, 35 тази проблематика се визуализира още по-ясно. Невъзможно е да се направи благодарение на тази оценъчна методика, ясна диференциация между пигментен тумор и оцветена тъкан. Авторът не дискутира тази тема и не представя данни за това как би могъл този проблем да бъде решен? Причина- и двете (меланомна тъкан и оцветен маркер) са оцветени в кафяв цвят. Този раздел от докторската работа би следвало да бъде изключен от изследването и да бъде определен по-скоро като негоден. Базираните на тази оценка изводи са неточни и могат да имат подвеждащ характер. Би следвало внимателно докторантът да се запознае с тази проблематика и при бъдеще докторат да използва подходящата методика. За целта:

1 Fecker LF, Geilen CC, Tchernev G, Trefzer U, Assaf C, Kurbanov BM, Schwarz C, Daniel PT, Eberle J. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *J Invest Dermatol.* 2006 Jun;126(6):1366-71.

2. Tchernev G, Orfanos CE. Downregulation of cell cycle modulators p21, p27, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related proteins Bax and Bak in cutaneous melanoma is associated with worse patient prognosis: preliminary findings. *J Cutan Pathol.* 2007 Mar;34(3):247-56.

Снимка 12 от дисертацията е неясна, визуализират се имена на фирми? Да се промени.

Резултатите от статистическия анализ (t test) на броя на новодиагностицираните случаи с кожен меланом за периода 2007/2016 на данните не показват статистически значими разлики, а само тенденция или нарастване на броя на новорегистрираните случаи, което е напълно обяснимо. За разлика от тези данни, смъртността през годините показва една статистическа значима разлика и прогресивна тенденция. За Варна и региона.

На фигура 27 е представено оцветяването на туморната тъкан anti CD3 АК. Снимката визуализира невъзможността на методиката да се отдиференцира положителното оцветяване с анти тялото от меланофагите или пигментната меланомна тъкан. Именно затова този вид оцветяване не се препоръчва. Причина затова е еднаквата кафява оцветка, която прави методиката негодна за този вид оценки. И в частност за меланомите. Виж български и същевременно международен принос по тази тематика:

1 Fecker LF, Geilen CC, Tchernev G, Trefzer U, Assaf C, Kurbanov BM, Schwarz C, Daniel PT, Eberle J. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *J Invest Dermatol.* 2006 Jun;126(6):1366-71.

2. Tchernev G, Orfanos CE. Downregulation of cell cycle modulators p21, p27, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related proteins Bax and Bak in cutaneous melanoma is associated with worse patient prognosis: preliminary findings. *J Cutan Pathol.* 2007 Mar;34(3):247-56.

Съществува риск от фалшиво позитивни резултати и получените статистически данни на базата на тази оценка са най-малкото несигурни. Същото важи за anti HMB АК, анти Braf анти тялото, представени на снимка 29 и 31. При докторски труд, съдържащ оцветки на анти тела, е желателно за всеки един пациент препаратите да бъдат снимани поотделно и представени като снимков материал (в представеният липсват каквито и да е данни, а е необходимо да има по три фотоса на всеки препарат). Същото е препоръчително и за всяка една положителна или отрицателна контрола (за всеки един пациент). Тези данни липсват в докторската работа. Липсва и секция имунохистохимична евалуация със снимков материал. Аналогично би следвало да се процедира и за анти VEGF и анти CD117 анти тела.

Следва авторът на дисертационния труд да раздели главата резултати и обсъждане в или на две отделни глави. Не е препоръчително в главата резултати, да има цитати на други статии и обсъждане на друг, неавторски материал.

Липсва прегледност, подреденост и идея на представения труд.

Отделно трябва да има подглава статистически анализ. Също без цитати от международни проучвания.

Последната прегледност на резултатите липсва и няма как да гадаем на базата на какво и как авторите стигат до съответните резултати, въпреки, че имайки предвид първоначално заложената неподходяща методика за детектиране на различни структури в меланомна тъкан (всичко в кафява оцветка), то последвалите анализи са без абсолютно никаква статистическа или прогностична стойност.

Независимо от липсата и пълното negliжиране на докторанта към съществените постижения на българската дерматоонкологична и дерматохирургична школа през последните години (което от една страна води говори за непознаване на материята като цяло, а оттук и до създаването на подобен вид трудове) в главата въведение, използваната от докторанта неподходяща методика (в частност за меланома и пигментираните лезии) и последвала евалуация на имунохистохимичните реакции при съответните пациенти (също базирана на липсата на осведоменост на ръководителя и докторанта по тематиката, глави: материали и методи), би следвало да се определи като пълно непознаване на материята, а изводите, базирани на гореспоменатите резултати- като спекулативни и абсолютно неприложими.

В актуалната си форма, представеният материал не съответствува категорично на критериите за придобиване на научната и образователна степен доктор на Варненския медицински университет.

С уважение

Проф д-р Г. Чернев

10.01.2018

