



**До Председателя на Научното жури,
Определено със Заповед № 109-356 / 12.06.2018 г на
Ректора на Медицински Университет Варна**

РЕЦЕНЗИЯ

ОТ

**ПРОФ. Д-Р ЛЮДМИЛА БОНЧЕВА АНГЕЛОВА, ДМ,
РЪКОВОДИТЕЛ КАТЕДРА „МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА“, МУ-ВАРНА,
НАЧАЛНИК ЛАБОРАТОРИЯ ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА УМБАЛ „СВ.
МАРИНА“ ВАРНА**

ОТНОСНО:

Дисертационен труд на тема „Корелационна зависимост между туморната ангиогенеза, мутационния товар, промените в кръвната картина и тромбогенния риск при пациенти с есенциална тромбоцитемия и полицитемия вера“

на **д-р Антонио Иванов Антонов**, докторант в самостоятелна форма на обучение в УС по хематология Катедра Вътрешни болести, МУ Варна, зачислен по докторска програма по „Хематология и преливане на кръв“ по област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1 Медицина за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“.

Научен Ръководител: Доц. д-р Лиана Герчева - Кючукова, дм

Със заповед № Р-109-199 от 23.05.2018 г. на Ректора на МУ – Варна съм избрана за член на Научното жури във връзка с дисертационния труд на д-р Антонио Иванов Антонов. Рецензията е изготвена съобразно изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав на МУ Варна.

Декларирам, че нямам конфликт на интереси с автора на дисертационния труд.

Кратки биографични данни за докторанта:

Д-р Антонио Антонов е роден през 1964г в гр. Плевен, където завършва и висшето си образование (ВМИ) през 1990г. Придобива специалност по Вътрешни болести през 1999г и

по Клинична хематология през 2001г. В продължение на 16 години (1996 - 2012) работи като лекар - асистент, старши и главен асистент в Клиника по хематология на УМБАЛ „Д-р Г.Странски“ Плевен; а от 6 години (2012-2018) като асистент в УНС по хематология и Клиника по хематология на УМБАЛ „Св.Марина Варна. Придобива професионални умения и компетенции адекватни за изпълнение на дейността по научната разработка, съчетаваща клинични и научна бази на двата университета. Няма информация за специализации и курсове у нас и в чужбина.

От представената автобиография става видно, че докторантът участва в 1 *научен проект от 2004, финансиран от Фонд „Наука“ МОН* „Проучване върху носителството за тромбофилични генетични дефекти и приноса му за развитие на тромботични усложнения при пациенти с есенциална тромбоцитемия“. Този факт, *проспективният подход* на проучване при пациентите от УМБАЛ „Герги Странски Плевен“, както и 3 обемни публикации все от този период показват *давността* и сериозното отношение към проблемите на генетичните дефекти към тромбофилия и риска за тромботични усложнения при пациенти с Есенциална тромбоцитемия и Полицитемия вера. Прави добро впечатление, че в 2 от 4 пряко свързани с настоящата дисертация публикации, докторантът е водещ автор и в 2 – втори автор.

Структура на дисертационния труд

Представеният за защита дисертационен труд е структуриран съгласно приетите изисквания. Съдържа общо 117 страници с включени в него: 40 таблици, 26 фигури и 2 приложения. В библиографията са отбелязани общо 164 заглавия, от които само 5 на кирилица и 159 на латиница. От тях почти две-трети (63 %) са от последните 10 години.

Актуалност на тематиката на дисертационния труд

Предоставеният за рецензия дисертационен труд засяга актуална тема свързана с най-честата причина за усложнения и повишена смъртност при две миелопролиферативни неоплазии (Полицитемия вера ПВ и Есенциална тромбоцитемия ЕТ), при които стриктното определяне на риска за тромботични събития (ТС) е от съществено значение за адекватното им лечение. Предотвратяването на усложнения при заболявания от групата на неоплазиите е основен приоритет на всяка здравна система с икономически, психологически и социални ползи. При болести свързани със сериозно намаление на средната продължителност на живот при пациентите, разгадаването на патогенетичните механизми и рисковата

стратификация от усложнение дават начало на широка профилактична дейност свързана и с възможност за индивидуализирана терапия.

У нас все още няма достатъчни проучвания и изследвания в тази област, а в достъпната литература са крайно дефицитни разработки, включващи съвкупността от предвидените за анализ в дисертационния труд фактори.

Доктор Антонов представя оригинални данни в търсене на молекулярно-генетични и патофизиологични фактори при възникване на ПВ и ЕТ и възможността за подобрене рисковата скала на тромботичните събития при тези пациенти

1. В литературния обзор (33 страници) авторът правилно систематизира, представя и обобщава научната информация по разработваните неоплазии. без да се увлича в излишни подробности. Условно, обзорът е разделен на три части и е онагледен с 12 фигури и 7 таблици. По мое мнение работата би спечелила, ако в тази глава е представена ролята и на други значими молекулярно-генетични фактори предразполагащи към тромбофилия, без да се акцентира върху ограничения свързани с тяхната изработка (РАI, протеин С и S. След обобщение на обзора, доктор Антонов логично извежда работната хипотеза, с което дава основателни аргументи за избора на разработваната тема, а именно липсата на общоприето мнение за групата фактори, участващи в тромбогенезата при ЕТ и ПВ; неуточнената роля на мутационния вариант на Jak2V617F в ТС, неизясненото влияние на факторите за вродена тромбофилия, носени от пациентите с двете заболявания. Т.е изследването на някои хематологични, молекулярно-генетични и патоморфологичните показатели би позволило създаването на по-акуратен прогностичен модел и провеждане на персонализирано риск-адаптирано лечение при пациентите с ЕТ и ПВ.

2. Целта е формулирана ясно - да се оцени ролята на някои *достъпни* молекулярно-генетични, патоморфологични и стандартни хематологични показатели при определяне на стратификацията за тромботичен риск при пациенти с ПВ и ЕТ. (Приемам изреждането на молекулярни *запетая* генетични показатели за техническа грешка вместо цяла дума с *тире*) Задачите са в синтезиран вид, правилно подбрани във връзка с изпълнението на целта. Основните задачи са 7 на брой като особен интерес в мен предизвикват първа, трета, четвърта и шеста задача:

- 1) връзката между алелния вариант на мутацията Jak2V617F и тромботичните усложнения;
- 2) анализ на значението на увеличаване левкоцитен брой, установен при дебюта на заболяванията за развитие на тромботични усложнения;

- 3) изследване за носителство на вродени фактори за тромбофилия при новодиагностицирани пациенти с ЕТ и ПВ и оценка на тяхното влияние върху появата на ТС;
- 4) проучване и анализ на връзките между костно-мозъчната ангиогенеза, мутационния товар на JakV617F, степента на спленомегалия и наличието на тромботични усложнения;
- 5) изработване на анкетна карта за оценка на риска от евентуални тромботични събития;
- 6) търсене на корелационна зависимост между всички подлежащи на настоящото проучване показатели, целяща определяне на независим прогностичен показател;
- 7) анализ на влиянието на патологично променените, стандартни хематологични показатели върху развитието на тромботичния процес.

3. Материал и методи (17 страници) – Обектът на изследване в дисертационния труд отразява мулти-дисциплинарния характер на разработката със *значима тежест на статистическата обработка* на данните (8 метода за анализ). За целите на настоящото изследване докторантът е включил проспективно и ретроспективно получени данни от достатъчен *общ* брой пациенти (199) с ЕТ и ПВ, разпределени в 2 основни групи (таблица 8). *Диагностичните критерии и рисковите групи са определяни според актуалната класификация на СЗО.*

Използвана е контролна група лица за имунохистохимичен анализ (10 бр) , както и контролна група за изследване факторите за вродена тромбофилия (112 клинично здрави индивиди, селектирани от 288 доброволци по стриктни и релевантни критерии).

Методичните подходи и лабораторни протоколи за молекулно-генетични и имунохистохимични изследвания в това колаборативно проучване са представени изключително изчерпателно. Подробното описание на методите позволява изследванията да бъдат възпроизведени без необходимост от ползване на допълнителна методична справка, което е полезно методично пособие за бъдещи докторанти и специализанти.

4. Разделът Резултати (25 страници) е много добре онагледен с таблици и фигури. Първоначално приетите две отправни постановки преди обработка на данните и подаване за статистическа анализ създават пропеедвична яснота - голяма част от резултатите са представени поотделно при двете нозологични единици, което е базирано на спецификите на всяко едно от заболяванията. Удачно е формулирането на конкретни групи въпроси с различна насоченост при двете диагнози, които да бъдат подадени за статистическия анализ.

Първична статистическа обработка позволява групиране и представяне на демографски, лабораторни и клинични данни на включените пациенти по диагнози.

Резултатите са разгледани в последователността на дисертационния труд, фокусиран основно към изясняването корелационната зависимост на разглежданите неоплазии с молекулярно-генетични изследвания (с тежест на JAK2 мутационния товар и тромбофилни фактори), следвани от промени в кръвната картина и костно-мозъчна ангиогенеза. Установява се тенденция за по-често развитие на ТС при пациентите с ЕТ, които са носители на мутацията Jak2^{V617F} в сравнение с тези, при които тя липсва. Мутационният товар на Jak2V617F (оценен чрез RT-PCR) не влияе на честотата на тромботичните събития при полицитемия вера, има несигнификантно гранично ($p=0,05$) нарастване при есенциална тромбоцитемия. Факторите за вродена тромбофилия са представени при малка група пациенти (43), но показват новаторско търсене на докторанта в хематологичното поле още от периода на проспективното изследване на докторанта. Те влияят върху честота на ТС и при двете нозологични единици. Това влияние е различно, но корелира с един малко изследван у нас тромбофилен фактор в областта на хематологията – гликопротеинов рецепторен ген Пб/Ша - P1A2/GP1Ia. Установява се статистически значима най-висока степен на възникване на тромбози по P1A2/GP1Ia, както в общата изследвана група, така и особено за полицитемия вера. Носителството на този полиморфизъм е над 5 пъти по-често при пациенти с тромботични събития в сравнение с асимптомни. Всички пациенти с известен значим тромбофилен фактор - мутация FVLeiden в хетеро или хомозиготно състояние са преживели тромботично събитие. Потвържда се мултифакторната предразполагаща етиология на вродената тромбофилия, свързана с двойно носителство на (повече от един генетичен дефект) и увеличаване на риска от тромботично събитие.

Като генетик не бих могла да коментирам в детайли отношението на промените в кръвната картина (в честност левкоцитния брой) към тромботичните събития, но резултатите в дисертационния труд не показват връзка между честотата и/или броя на ТС и величината на левкоцитния брой при пациентите с ЕТ. Намирам идеята за търсене на тази корелация като принос на докторанта поради липсата на публикации в този област (с изключение на едно проучване от 1994 г.). При пациентите с ПВ и ЕТ се установява статистически значима връзка между степента на костно-мозъчната ангиогенеза, Jak2^{V617F} мутационния товар $\geq 50\%$ или $< 50\%$, размера на слезката и броя на тромботичните събития.

5. В Раздел Дискусия (17 стр) докторантът дава аргументирано обяснение на всички анализирани показатели, като показва добри познания и подчертан принос в търсене на логиката на факторите, участващи в тромботичния процес при пациентите с ЕТ и ПВ. Излиза се извън рамките на хематологичното познание и се навлиза в интердисциплинарни разсъждения с включване на молекулярни и патоанатомични изследвания голяма част от които не се вземат под внимание в рутинната медицинска практика.

Много логичен е анализът на докторанта и изказаната хипотеза, че високият мутационен товар в Jak2V617F би трябвало да води до пролиферация на повече активирани клетки от миелоидната редица и съответно до нарастване на тромбогенния риск. Липсва потвърждение на корелация между честотата на тромботични събития и степента на мутационен товар на Jak2V617F при пациентите с Полицитемия вера. Независимо, че изглежда логична хипотезата, патофизиологичната зависимост не може да докаже влиянието си на практика и вероятно обяснение се крие във факта, че при рутинната методиката на Real-Time PCR количествено се определя броят на мутирани алели в **общия** брой левкоцити. Клетъчното разпределение на мутиралите алели, обаче, е логично различно при болните с еднаква степен на мутационен товар.

По отношение на промените в кръвната картина, се намира, че и при двете диагностични групи левкоцитозата не доказва своето значение като самостоятелен рисков фактор за развитие на тромботични събития. Авторът приема за вероятна причината, че тя няма самостоятелна роля в развитието на тромботичните събития, а всъщност опосредства ефекта на Jak2V617F мутацията. От тази гледна точка по-важно би било да се търси ефекта на абсолютния брой на качествено променените Jak2V617F левкоцити върху честотата на тромботични събития, а не на общо увеличения левкоцитен брой при поставяне на диагнозата. Интерес представлява предложението за изследване на причината за нарастващата левкоцитоза - загуба на хетерозиготност на Jak2V617F, поява на друга мутация или пълна загуба на вътреклетъчен контрол на STAT.

Наличието на вродена тромбофилия увеличава тромбогенния риск при ПВ и ЕТ. Установява се най-висока степен на асоциация с тромбози на P1A2/GPIIIa, както в общата изследвана група (41.7%; p=0.004 OR- 4.62), така и особено при Полицитемия вера (46.2%; p=0.01; OR=5.54), което потвърждава не само резултатите на сериозно проучване на V. Afshar-Kharghan, V.,2004, но и в 2 авторски публикации на докторанта от 2007, нецитирани в книгописа на дисертационния труд.

Проучването потвърждава силната корелационна зависимост между увеличената костно-мозъчната ангиогенеза и степента на спеномегалия и се предполага общ процес на съдовата система нарушаващ ендотелната функция, съдовата регенерация и ускоряващ развитието на атеросклерозата. В тази насока се интерпретират и резултатите по отношение евентуална връзка между костно-мозъчната ангиогенеза и честотата на тромботичните събития. Независимо, че авторът не установява статистическа корелация между последните два фактора, се забелязва тенденция за израз на една обща ендотелна болест, която с времето се разраства и ангажира все по-голяма част от съдовете.

Много логичен е изводът за необходимост от смяна в подхода за оценка на тромботичните събития при ПВ и ЕТ поради факта, че патологичните фактори и условия са различни при ПВ и ЕТ. Предлага се проучване локалните причини за развитие на тромботичните събития, в т.ч. използване възможностите на новите доплер-ехографски методики при пациентите с ПВ и ЕТ, за оценка на кръвотока в жизненоважните органи, засегнати от ТС.

6. Изводи и приноси. Изводите са в съответствие с получените резултати и следват поставените в дисертационния труд задачи.

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).

Авторът представя и 2 приложения, целящи прецизиране на практическия подход при пациентите с ПВ и ЕТ.

Приложение №1 „Кога, какво, как?“ предлага алгоритъм за изследване на пациенти с ЕТ и ПВ за носителство на вродена тромбофилия. Намирам приложението за удачно, като смятам, че може да се опрости отговора на „Кога“ (1 и 2 точка).

Приложение №2 представлява анкетна карта с практическо значение за търсене на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с миело-пролиферативни неоплазии.

Приносите са представени в 3 групи, съдържано, особено в частта си на *приложно* значение, където съвсем правилно се предлага по-скоро „един примерен, рационален подход за насочване към изследване за вродена тромбофилия“.

- *с оригинален характер*: За първи път у нас е проведено изследване на факторите за вродена тромбофилия при пациенти с ПВ и ЕТ и анализ на влиянието им върху тромботичния процес. За първи път е изследвана връзката между костно-мозъчната ангиогенеза, спленомегалията и честотата на тромботичните събития при тези пациенти.

- *с потвърдителен характер*: Потвърдена е липсата на корелационна зависимост между степента на мутационен товар на $Jak2^{V617F}$, изследван чрез qRT-PCR и честотата на ТС и са формулирани вероятните причини за това. Потвърдена е липсата на корелация между промените в стандартните хематологични показатели, вкл. наличието на левкоцитоза при пациентите с ПВ и ЕТ и честотата на ТС. Потвърдена е корелационната зависимост между мутационния товар на $Jak2^{V617F}$, наличието на промени в стандартните хематологични показатели и степента на спленомегалия.

- *с приложен характер*: - рационален подход за насочване към изследване за ВТ

По мое мнение най-същественният принос на дисертационния труд е клинична му ориентираност (изследвани 199 пациенти с неоплазии) и опита на автора да тълкува наблюдавания фенотип в контекста на молекулярно-генетични, имунохистохимични, клинично-лабораторни изследвания както в научен, така и в практичен аспект. Смятам, че ще бъде единодушно мнението на членовете на научното жури за прецизната статистическа обработка на резултатите, което ги прави теоретично и практично значими, дори в случаите, при които не се установява сигнификантна разлика. Докторантът не се фокусира само върху статистическите данни от изследванията, а прави логична взаимовръзка на всички компоненти на поставените задачи.

7. Критични бележки и препоръки

Намирам, че акцентът на работата е в молекулярно-генетичните изследвания (мутационният товар на Jak2^{V617F} - самостоятелно и в корелация с размер на слезка и брой тромботични събития; ДНК анализ на генни *варианти* предразполагащи към тромбофилия – един от тях с известна *мутация* - фактор V Leiden. В този план на мисли, оценявам тези изследвания като водещи за корелационните зависимости в заглавието на темата, каквато е и последователността на поставените задачи и изводи (1 и 3). Може би докторантът е имал в съображение неголемия брой пациенти, изследвани за тромбофилни генни варианти (42) в по-ранен етап от проучването. Препоръчвам продължение на тези изследвания в Лабораторията по медицинска генетика във Варна (изпълняват се от юни 2016), включително гена на тромбоцитния гликопротеинов рецептор IIb/IIIa-PIA2/GPIIIa (вместо MTHFR), при който авторът изразява мнение за регистрирани по-високи честоти при пациенти с полицитемия вера.

Неточностите в книгописа и някои цитирания, ненужни съкращения и др. ги отдавам на дефицит на техническо време.

8. Заключение: Дисертационният труд демонстрира познанията на докторанта в областта на биологичните науки и тяхното клинично приложение. Разработката е актуална, отговаря на наукометричните критерии съобразно правилника за академично развитие на МУ-Варна за присъждане на научно-образователна степен „Доктор“. Препоръчам на научното жури да присъди научно-образователна степен „доктор“ по научна специалност „Хематология и преливане на кръв“ на д-р Антонио Иванов Антонов.

21. 06. 2018 Член на НЖ:



ПРОФ. Д-Р ЛЮДМИЛА АНГЕЛОВА, ДМ