

ДО
ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО ЖУРИ
ОПРЕДЕЛЕНО СЪС ЗАПОВЕД №Р-109-199/23.05.2018
НА РЕКТОРА НА МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” - ВАРНА
ПРОФ. Д-Р КРАСИМИР ИВАНОВ, ДМН

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Георги Николаевич Балаценко, дм
Началник Диагностично-консултативен блок,
Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични
заболявания – ЕАД, София

Относно: Дисертационен труд за придобиване на научна и образователна степен „Доктор“ на тема „КОРЕЛАЦИОННА ЗАВИСИМОСТ МЕЖДУ ТУМОРНАТА АНГИОГЕНЕЗА, МУТАЦИОННИЯ ТОВАР, ПРОМЕНЕТЕ 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 област на висше образование – “7. Здравеопазване и спорт”, професионално направление “7.1 Медицина”, научна специалност “Хематология и преливане на кръв” към Медицински университет – Варна, факултет „Медицина“, Катедра по вътрешни болести, УНС по хематология и клиника по клинична хематология към МБАЛ „Св. Марина“ ЕАД – Варна, отчислен със заповед на Ректора на МУ - Варна № Р-109-199 от 23.05.2018 г.

АКТУАЛНОСТ НА ПРОБЛЕМА

Дисертационният труд е посветен на един от актуалните проблем на съвременната хематология – значението на различни фактори (туморна ангиогенеза, мутационен статус, промени в кръвната картина) за тромбогенния риск при пациенти с есенциална тромбоцитемия (ЕТ) и полицитемия вера (ПВ). Тези две заболявания се отнасят към групата на миелопролиферативните неоплазии (МПН), включваща клонални заболявания, чиято патогенеза се свързва с малигнена трансформация на хемопоетична стволова клетка, настъпваща в резултат на придобити генни мутации. МПН се характеризират с клонална експанзия на една или повече миелоидни клетъчни линии в костния мозък със запазена матурация, левкоцитоза, еритроцитоза или тромбоцитоза в периферната кръв, спленомегалия и склонност към прогресия към костномозъчна фиброза или трансформация в остра левкемия, макар и с различна честота при отделните заболявания. От всички МПН, ПВ и ЕТ се

характеризират с протрахирано клинично протичане, ниска честота на трансформация в остра левкемия (съответно 4.9-6% и 0.8-4.9% на 10-та година) и относително дълга обща преживяемост, съответно от 14 и 20 години. Основният риск при тези 2 заболявания са тромботичните събития, чията кумулативна честота е съответно 11.3-20% (ПВ) и 10.3-50% (ЕТ), и асоциираните с тях усложнения. Поради тези причини, основната цел при ПВ/ЕТ е да не се допусне развитието на тромбози, като отграничаването на пациенти с повишен риск е с ключово значение в тази насока. Рутинно използваните в практиката прогностични маркери за стратифициране на болните включват: (1) анамнеза за предхождащи съдови инциденти и (2) напреднала възраст. Имайки предвид изключително комплексност на механизмите, участващи в регулацията на хемостазата, както и разнообразието в патофизиологията на нарушенията при МПН, е очевидно, че само тези две променливи, макар и с доказана клинична значимост не изчерпват многообразието от различни биологични фактори, които биха могли да имат значение за риска от тромботични усложнения. Това е основание през последните години усилията да са насочени към преценка на някои добре познати и търсене на нови, допълнителни биомаркери и фактори, както и разработването на нови прогностични модели, които да подпомогнат индивидуализирането на диагностичния и терапевтичен подход на пациентите с ПВ и ЕТ.

Имайки предвид гореописаното, проучването на фактори и биомаркери, които биха могли да бъдат асоциирани с повишен тромбогенен риск и определянето на корелационната зависимост помежду им е актуално и с изразена научна и практическа значимост.

СТРУКТУРА И ОФОРМЛЕНИЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Дисертационният труд е оформен в съответствие с изискванията на “Правилника за развитието на академичния състав в МУ – Варна“ и е разработен на 117 стандартни страници, онагледен е с 26 фигури, 48 таблици и 2 приложения. В структурата му са включени общоприетите раздели, разпределени както следва: **Титулна страница** [1 страница (стр.)]; **Състав на научното жури** [1 стр.]; **Съдържание** [1 стр.]; **Използвани съкращения** [1 стр.]; **Въведение** [2 стр.]; **Изложение:** (i) Литературен обзор [30 стр.]; (ii) Работна хипотеза [1 стр.]; (iii) Цел и задачи [1 стр.]; (iv) Материали и методи [17 стр.]; (v) Резултати и обсъждане [42 стр.]; (vi) Заключение [1 стр.]; (vii) Изводи [1 стр.]; **Приноси** [1 стр.]; **Приложения** [2 стр.] и **Библиография** [15 стр.].

Библиографията съдържа 164 литературни източника, от които 5 на кирилица и 159 на латиница, като 16 (10%) от цитираните трудове са публикувани през последните 3 години, а 35 (21%) - през последните 5 години.

Авторефератът е написан на 72 стандартни страници и съответства на дисертационния труд.

Литературният обзор е задълбочен и показва добрата информираност на докторанта относно честотата и значението на тромботичните събития като основна причина за инвалидизация и смърт при ПВ/ЕТ. Подробно са разгледани редица

проблеми, свързани с патофизиологията и механизмите водещи до тромботични усложнения, за които данните от литературата се противоречиви или които не са добре изяснени. Обзорът включва три основни части: (1) *Значение на тромботичните усложнения за прогнозата при ПВ/ЕТ*; (2) *Патофизиологични фактори за развитието на тромботични събития*, между които: увеличеният брой и/или функционалните нарушения на еритроцитите, левкоцитите и тромбоцитите, нарушенията в съдовия ендотел и прокоагулационни промени в плазмата; и (3) *Потенциални рискови фактори за развитие на тромботични събития*, като особено внимание е обърнато на значението на някои фактори за вродена тромбофилия, мутацията *JAK2 V617F* и трайното активиране на Jak-STAT сигналния път, костно-мозъчна ангиогенеза и др.

Въз основа на представените данни и анализа на състоянието на изследванията по проблема в литературата Докторантът аргументирано обосновава необходимостта от провеждане на допълнителни изследвания в тази насока и изгражда **работната хипотеза**, че тромботичните усложнения, които са с определяща роля за болестността и преживяемостта при ПВ/ЕТ, имат сложна и мултифакторна генеза поради което, анализирането на влиянието на промените в хематологичните, молекулярните, патоморфологични показатели върху тромботичните събития, както и оценката на значението на съпътстваща вродена тромбофилия би позволило създаването на по-акуратен прогностичен модел от понастоящем използвания подход и съответно провеждане на по-добро риск-адаптирано лечение.

Целта на дисертационния труд е ясна и конкретна „Да се оцени влиянието на някои достъпни молекулярни, генетични, патоморфологични и стандартни хематологични показатели в рисковата стратификация на тромботичния риск при болни с Полицитемия вера и Есенциална тромбоцитемия“.

За постигането на тази цел са **формулирани 7 задачи**, които са логически свързани и позволяват многостранно характеризирание на процесите, свързани с повишения риск от тромбози при ПВ/ЕТ - да се проучи и анализира връзката между тромботичните усложнения и алелния товар на мутацията *JAK2 V617F*; патологично променените стандартни хематологични показатели, вкл. увеличения левкоцитен брой при диагнозата на заболяванията; носителството на вродени фактори за тромбофилия; костно-мозъчната ангиогенеза, степента на спленомегалия и др., както и да се изработи анкетна карта за оценка на тромботични събития и да се потърси корелационна зависимост между изброените показатели с възможност за определяне на независим прогностичен показател.

Материали и методи. В проучването са включени 199 пациенти, от които 125 с ПВ и 74 с ЕТ, диагностицирани съгласно препоръките на класификацията на МПН на Световната здравна организация. Като цяло, броят на пациентите е достатъчен за получаване на статистически обосновани резултати и изводи, въпреки че при някои отделни експериментални постановки включеният брой пациенти е малък, поради което получените резултати очертават единствено тенденции, но без да достигат статистическа значимост. В проучването са включени и контролни групи лица, чийто избор и демографски характеристики са адекватни на поставените задачи и позволяват коректна интерпретация на получените резултати. През отделните етапи от проучванията, свързани с разработването на дисертационния труд, са използвани

както рутинни клинични и лабораторни изследвания, така и специфични диагностични подходи, съобразени с вида и целите на конкретните изследвания – костномозъчна трепанобиопсия с определяне на целуларитета, наличието и степента на фиброза, оценка на ангиогенезата чрез имунохистохимично определяне на експресията на CD34 в костния мозък, молекулярно-биологични изследвания, основаващи се на полимеразно-верижна реакция (PCR) за определяне на мутациите *JAK2* V617F, R506Q в гена на коагулационния фактор V (F5rs6025; factor V Leiden, FVL), G20210A в протромбиновия ген (*FII* G20210A), C677T в гена на ензима метилентетрахидрофолат редуктаза (*MTHFR* C677T) и полиморфизма A1/A2 (rs5918) в гена, кодиращ интегрин $\beta 3$ (*ITGB3*). Получените данни са анализирани посредством статистическия пакет SPSS 19 и широк спектър от статистически подходи, гарантиращи достоверност на извършените анализи.

Резултатите са описани в логична последователност и са подробно онагледени, като отговарят напълно на поставените задачи. При представянето на получените данни, част от резултатите са дадени поотделно за ПВ и ЕТ, което се обяснява с особеностите в патогенезата и различията в биологията на двете заболявания, докато други - са разгледани общо.

Според вида на поставените въпроси за разрешаване и проведените проучвания, резултатите за групирани в 5 раздела, в 4 от които е разгледано въздействието върху тромботичните събития при МНП на различни фактори, като директно въздействие или опосредствано с участието на други механизми, между които: (1) Мутационен статус на *JAK2* V617F; (2) Левкоцитоза; (3) Генетични дефекти за вродена тромбофилия; и (4) Костно-мозъчна ангиогенеза. В последния раздел са разгледани въпроси, свързани с оценка на прогностичната стойност на изследваните показатели.

Като отправна точка на проучването е представено детайлно характеризиране на демографските, клиничните и лабораторни особености на изследваната група пациенти с ПВ и ЕТ и рисковата им стратификация съгласно сега възприетите прогностични критерии: *възраст* (над/под 60 години) и *анамнеза* за прекарани тромботични процеси, като към момента на диагнозата над половината от пациентите с ПВ и ЕТ попадат в групата с висок риск от съдови инциденти (ЕТ – 55.6%; ПВ - 54.4%).

При ПВ е установена по-висока честота на хомозиготно носителство на *JAK2* V617F при жени, като мутационния статус проявява асоциация със спленомегалията, съответно при отсъствие на мутацията, спленомегалия се среща в 36% от пациентите, при хетерозиготно носителство - в 49% и при хомозиготно носителство – в 75%. В проучването не е намерена значимо по-висока честота на тромботични събития, зависима както от *JAK2* V617F мутационния товар, така и от степента на спленомегалия, което предполага че нарушената регионална хемодинамика няма основно значение за появата на тромбози. При ЕТ, тромботични събития са регистрирани в 33% от пациентите, като не е намерена значима корелация между възрастта и развитието на тромбози, както и различия в честотата на тромбозите в групите с висок и нисък риск, съгласно сега възприетите критерии, което показва, че стратифицирането единствено въз основа на тези 2 фактора няма

коректна прогностична стойност. При ЕТ, *JAK2* V617F мутацията се доказва в 42%, от които в 7% под формата хомозиготно носителство, като аномалията е по-честа при жени. Намерена е тенденция за по-чести тромботични събития при пациенти, носещи *JAK2* V617F в сравнение с тези, които са отрицателни за мутацията, което съответства на данните от последните години за необходимостта от добавяне на мутационния статус като допълнителен рисков фактор в новите прогностични скорове.

При ПВ, не е установена корелация между броя на левкоцитите и честотата на тромботичните събития, типа им (артериални и венозни), вида им, тежестта им, пола, възрастта и алелния товар на *JAK2* V617F. Единствената наблюдавана корелация е левкоцитозата при болни със спленомегалия за разлика от нормалния левкоцитен брой в случаите с нормална големина на слезката. При ЕТ, също така не е намерена асоциация между наличието на левкоцитоза и честотата и броя на тромботичните събития. За разлика от ПВ, при ЕТ хомозиготното носителство на *JAK2* V617F е свързано със значимо по-висок левкоцитен брой в сравнение с пациенти, при които аномалията отсъства.

Установено е, че половината от пациентите с ЕТ и ПВ носят поне един от изследваните маркери за вродена тромбофилия, което е значимо по-високо от това, при здрави контроли. При МПН е по-висока също така и честотата на двойно носителство на тези генетични дефекти спрямо контролната група, като единият от маркерите в комбинацията винаги е *PIA2/GPIIIa*. Същевременно са наблюдавани различия в разпространението на отделните нарушения – честотата на някои от аномалиите (*FVLeiden*; *FII G20210A*; *MTHFR C677T*) е сходна при МПН и в контролната група, докато честотата на *PIA2/GPIIIa* е значимо по-висока при ПВ/ЕТ спрямо контролната група, с тенденция за по-висока честота при ПВ.

Общо, тромботични усложнения при пациенти с ПВ/ЕТ са установени в 57% (честотата им е сходна при 2-те заболявания) от пациентите, като изразено преобладават артериалните тромбози. Доказано е, че при пациенти с ПВ/ЕТ, имащи тромботични усложнения, носителството на генетични дефекти за вродена тромбофилия е значително по-високо от това, в контролната група, като най-често появата на тромбози е асоциирано с *PIA2/GPIIIa*, (особено при ПВ) и с мутацията *PR G20210A* (особено при ЕТ). При съпоставяване на честотата на генетичните нарушения, асоциирани с придобита тромбофилия при пациенти с ПВ/ЕТ, съответно със и без тромботични усложнения е установено, че: *FVLeiden* се среща само при наличие на тромботични събития; честотата на мутацията *PR G20210A* е сходна в групите с и без тромбози; докато полиморфизмът *PIA2/GPIIIa* е над 5 пъти по-чест при наличие на тромботични събития (особено при ПВ). Мутацията *MTHFR C677T* се среща еднакво често както при наличие на тромбози, така и при отсъствие на такива, но когато аномалията е в комбинация с *PIA2/GPIIIa* относителният дял на двойно положителните пациенти с тромбози достига 80%.

Оценката на костномозъчната ангиогенеза показва значима асоциация с диагнозата (по-изразена при ПВ), *JAK2* мутационния статус (по-изразена при носителство на *JAK2* V617F); степента на мутационния товар (по-изразена при хомозиготи), с размера на слезката (по-изразена при масивна спленомегалия) и тенденция за

по-висока честота при по-голям брой тромботични събития.

При анализа на влиянието, което оказват молекулярните, патологоанатомичните и рутинните лабораторни показатели при пациенти с ПВ/ЕТ не е установена значима корелационна зависимост и не е обособен независим прогностичен показател за развитието на тромботично събитие.

В Дискусията, получените резултати са анализирани в светлината на данните от литературата, като докторантът демонстрира способност да обобщава, изгражда хипотези и да ги аргументира. Представени са данни от други, сходни проучвания които съответстват и подкрепят получените резултати, като обстойно са изяснени възможните причини за наблюдаваните несъответствия с други проучвания. Ясно е очертана теоретичната значимост на получените резултати и практическите аспекти на анализираните зависимости и факторите имащи значение за риска от тромботични усложнения при ПВ/ЕТ. Обобщаването на получените данни очертават становището, че тромбозата при МПН е мултифакторен и многоетапен процес, чиято клинична изява може да бъде резултат на различни механизми, което изисква комплексен диагностичен и терапевтичен подход. В тази насока, факторите с прогностична значимост за тромбози не трябва да се обсъждат изолирано, а като взаимосвързани и в динамика. Същевременно, установените данни, че патофизиологичните механизми, водещи до развитието на тромбози са различни в зависимост от конкретното заболяване (ПВ спрямо ЕТ) и съдовете, които се засягат (артериалните спрямо венозни), налагат диференциран подход при всеки един болен и дефинират пациентите, при които провеждането на някои допълнителни изследвания, особено тези за доказване на генетични аномалии, асоциирани с тромбофилия би позволило тяхното по-добре терапевтично повлияване.

Изводите в дисертационния труд са изчерпателни, произлизат от получените резултати и съответстват напълно на поставените задачи: (1) Мутационният товар на *JAK2 V617F* не влияе на честотата на тромботичните събития при ПВ, докато при ЕТ, мутацията води до несигнификантно нарастване на тромбозите; (2) Левкоцитният брой към момента на диагнозата няма прогностично значение за развитието на тромботични събития; (3) Факторите за вродена тромбофилия значимо увеличават риска за тромботично събитие, като носителството на дори един генетичен дефект увеличава около 4 пъти тромбогенния риск в сравнение с неносители, а двойното носителство е свързано с нарастване на риска до 7 пъти; (4) Костно-мозъчната ангиогенеза корелира с мутационния товар и спленомегалията, но не и с честотата на тромботичните събития при ПВ/ЕТ; (5) Отсъствието на корелация между мутационния товар на *JAK2 V617F*, левкоцитозата и честотата на тромботичните събития при ПВ не позволява включването им в разширен прогностичен индекс; (6) Патологичните промени в 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; (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 различите условия на тромбогенеза е необходимо създаването на тромбогенни индекси, различни не само за двете заболявания, но и за различните отдели на съдовата система (артериална и венозна).

Научни приноси

Научните приноси на д-р Антонио Антонов са формулирани в 3 основни направления:

Приноси с оригинален характер: (1) Проведено е изследване на факторите за вродена тромбофилия и анализ на влиянието им върху тромбоцитния процес при пациенти с ПВ и ЕТ; (2) Изследвана е връзката между костно-мозъчната ангиогенеза, спленомегалията и честотата на тромбоцитни събития.

Приноси с потвърдителен характер: (1) Потвърдена е липсата на корелация между степента на мутационен товар на *JAK 2V617F* и честотата на тромбоцитни събития и са формулирани вероятните причини; (2) Потвърдена е липсата на корелация между промените в стандартните хематологични показатели, вкл. левкоцитозата при ПВ и ЕТ и честотата на тромбоцитни събития; (3) Потвърдена е корелационната зависимост между мутационния товар на *JAK2 V617F*, промените в стандартните хематологични показатели и степента на спленомегалия.

Приноси с приложен характер: (1). Изработен е алгоритъм за провеждане на изследване на факторите за вродена тромбофилия при пациенти с ПВ и ЕТ; (2) Изработен е алгоритъм „какво? как? кога?“ за изследване на факторите за вродена тромбофилия.

* **Забележки:** Приемам формулираните приноси със следните забележки:

(1) Принос №2 от групата „Приноси с оригинален характер“ е формулиран: *Изследвана е връзката между костно-мозъчната ангиогенеза, спленомегалията и честотата на тромбоцитни събития.* Тази формулировка е непълна и неточна, като приносът на Докторанта не е в самото проведено изследване, а получените резултати, тяхната интерпретация и анализ.

(2) Принос №1 от групата „Приноси с приложен характер“ е формулиран: *Изработен е алгоритъм за провеждане на изследване на факторите за вродена тромбофилия при пациенти с ПВ и ЕТ.* Разработеният от Докторанта алгоритъм представлява предложение за цялостен подход за оценка на риска от тромбоцитни събития към момента на диагнозата, поради което предложената формулировка на приноса не отразява комплексния характер на този алгоритъм и неговата многостранност.

Трудове във връзка с дисертацията

Приложеният списък на научните трудове, свързани с дисертационния труд включва 6 пълнотекстови статии в български научни издания и 1 научно съобщение, от които:

Литературен обзор (1 бр.), на който д-р Антонио Антонов е съавтор.

Оригинални статии (4 бр.), на 2 от които д-р Антонио Антонов е първи автор

(едната е под печат), на една – е втори автор, и на една – последен автор.

Клиничен случай (1 бр.) с мултидисциплинарен авторски колектив, включващ и докторанта.

Научно съобщение (1бр.), представено на Национална конференция по хематология (2017), което д-р Антонио Антонов е първи автор.

Критични бележки:

1. Дисертационният труд е с множество правописни и технически грешки.
2. Фигури и таблици: фиг. 25 представлява таблица, която е взета от чуждестранен източник и е на английски език, без да бъде преведена; пропуснато е обозначаването „таблица №31”, която е индексирана като №32; последната таблица, която би следвала да бъде с №49 е означена като таблица №40, като по този начин има 2 различни таблици с №40.
3. Библиография: Липсва каквато и да е унифицираност при изписване на авторските колективи в литературните източници; една от библиографиите е цитирана 2 пъти (№9 и №135); цитираният труд под номер №136 включва обозначението: Petrides, P.E., MPN 2017. 2017, което е непълно, неясно и не позволява идентифицирането на източника.

Критичните бележки касаят техническото оформление и стиловата редакция на дисертационния труд, и по никакъв начин не намаляват неговата научна стойност.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на описаното по-горе считам, че представеният дисертационен труд от д-р АНТОНИО ИВАНОВ АНТОНОВ отговаря напълно по вид и обем на специфичните изисквания на Закона за развитието на академичния състав в Република България и “Правилника за развитието на академичния състав в Медицински университет – Варна. Докторантът притежава задълбочени теоретични знания по отношение на механизмите и факторите, имащи значение за развитието на тромботични усложнения при пациенти с полицитемия вера и есенциална тромбоцитемия, проявява способност за творческо интерпретиране на данните от рутинните лабораторни и високо-специализираните изследвания, и може да изгражда научни хипотези, благодарение на което са получени научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос.

Изложеното по-горе ми дава основание да дам убедено положителна оценка на дисертационния труд и да предложа на почитаемото Научното жури да присъди образователната и научна степен “ДОКТОР” на д-р АНТОНИО ИВАНОВ АНТОНОВ.

София

21.06.2018

Проф. Д-р Георги Балаценко.....