

СТАНОВИЩЕ

*Относно дисертационния труд на д-р Антонио Иванов Антонов,
докторант в самостоятелна форма на обучение,
за придобиване на научната и образователна степен „доктор“, отчислен
със заповед на Ректора на МУ - Варна № Р-109-199 от 23.05.2018 г.*

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**

Актуалност и дисертабилност

Групата на отрицателните за Филадельфийска хромозома миелопролиферативни неоплазми (МПН) е твърде разнородна. Въпреки, че значение за появата и развитието им имат едни и същи, доказани “driving” мутации ($JAK2^{V617F}$, MPL, CALR, а вероятно и други), протичането, усложненията и преживяемостта на пациентите при различните нозологични единици, обособяващи тази група, значимо се различават. Есенциалната тромбоцитемия (ЕТ) и Полицитемия вера (ПВ) са двете заболявания с възможно най-продължителна преживяемост. Все по-често те се диагностицират при лица на възраст под 50 г., при които, ако липсват усложнения може да се очаква преживяемост, близка до референтната за същата възрастова група. Последното може да се постигне чрез прецизиране на адекватна профилактика на очакваните усложнения и навременното им лечение.

След многобройни проучвания, извършвани и публикувани през последните десетилетия, е доказано, че най-честата причина за усложнения и повишена смъртност при ЕТ и ПВ са тромботичните събития (ТС). Ето защо, стриктното определяне на степента за риск от възникване на тромбози е жизнено важно за определяне на адекватното им профилактиране и лечение. Засега утвърдените фактори за оценка на риска от възникване на ТС при ПВ и ЕТ са възрастта при поставяне на диагнозата (под или над 60 г.), анамнезата за прекарано в миналото ТС и наличието на съпътстващо сърдечно-съдово заболяване.

Разгадаването на молекулярните патофизиологични промени, които настъпват при ПВ и ЕТ предизвиква възникване на редица въпроси: „Какво е влиянието на Jak2^{V617F} мутационния товар върху развитието на тромботични събития“?; „Влияе ли увеличеният левкоцитен брой, който е характерен за МПН, върху тромботичния процес“?; „Каква е честотата и въздействието на факторите за вродена тромбофилия (ВТ) при тромботичните усложнения, характерни за ЕТ и ПВ“?; „Имат ли значение променените хематологични показатели за развитие на тромботичните събития“?; „Съществува ли връзка между степента на костно-мозъчната ангиогенеза и начина на протичане на ЕТ и ПВ, включително ТС“? и не на последно място „Възможно ли е да се подобри настоящата рискова скала, което да доведе до евентуална промяна в профилактиката на ТС и цялостното лечение на пациентите“?;

Дисертационният труд на д-р Антонио Антонов е посветен на търсене на отговор на всички тези въпроси.

Поради факта, че в достъпните ни публикации има недостатъчно проучвания в тази област, отговарящи на посочените въпроси, при това с противоречиви резултати, считам, че избраната тема на дисертационния труд е актуална и с потенциал за конструиране на редица научни и практически приноси.

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд на д-р Антонио Иванов Антонов е структуриран класически, съдържайки кратък увод, насочващ читателя към проучвания проблем; литературен обзор, завършващ с плавен преход към набелязаната цел и задачи; работна хипотеза, маркираща необходимостта от извършените проучвания; цел и задачи; материал и методи; резултати от проведените научни изследвания; дискусия и заключение.

Литературният обзор е съставен от три части: 1) прогностично значение на ТС при ПВ и ЕТ, 2) доказани патофизиологични фактори за развитие на ТС и 3) потенциални рискови фактори (роля на факторите за вродена тромбофилия, на мутационния товар от JAK2^{V617F} и на костномозъчната ангиогенеза). Той е отлично онагледен с 12 фигури и 7 таблици. Логично, литературният обзор завършва с анализ на предпоставките за необходимостта от изработването на дисертационния труд, а именно липсата на общоприето мнение за групата фактори, участващи в тромбогенезата при ЕТ и ПВ; неуточнената роля на мутационния товар на Jak2^{V617F} в ТС, неизясненото влияние на факторите за вродена тромбофилия, носени от пациентите с двете заболявания. Досега в достъпната литература липсват проучвания, даващи отговор на въпроса дали туморната ангиогенеза в костния мозък би могла да бъде модел на изучаване на съдовите промени при МПН и има ли тя връзка с тромботичния процес.

Считам, че литературният обзор запълва съществена празнота в познанията за тромботичните явления, не само при ПВ и ЕТ, но изобщо в цялостната системна патология. Базирайки се на прецизната му детайлност, може да се приеме, че литературният обзор на дисертационния труд на д-р Антонио Антонов носи черти на монографичен труд.

Работната хипотеза е структурирана правилно и включва логичната възможност тежестта на молекулярния $Jak2^{V617F}$ товар да определя патофизиологичните промени в броя на засегнатите клетъчни популации и хемореологията на кръвния ток, като модифицира всеки един от факторите в триадата на Вирхоф и действа протромбогенно. Залага се на индиректната оценка на степента на тези промени, получена чрез анализ на отклоненията в стандартните хематологични показатели. В реалната медицина развитието на ПВ и ЕТ нерядко може да започне на фона на неуточнено преди това носителство на вродена тромбофилия, което се явява допълнителен тромbogenен фактор. Анализирането на промените в хематологичните, молекулярните, патоморфологичните показатели и влиянието им върху тромботичните събития би позволило създаването на по-акуратен прогностичен модел и провеждане на персонализирано риск-адаптирано лечение при пациентите с ЕТ и ПВ.

Считам, че работната хипотеза е правилно конструирана и се базира на задълбочен анализ на достъпната до този момент литература.

Целта и задачите са насочени към търсене на отговори на нерешените досега въпроси за прецизността на рисковата стратификация при пациентите с ЕТ и ПВ, често с противоречиви резултати в литературните източници. Целта включва оценка на ролята на някои достъпни молекулярно-генетични, патоморфологични и стандартни хематологични показатели при определяне на стратификацията за тромботичен риск при пациенти с ПВ и ЕТ. Постигането на тази цел е обвързано с подробното проучване на 1) връзката между алелния товар на мутацията $Jak2^{V617F}$ и тромботичните усложнения; 2) анализ на значението на увеличения 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 Jak^{V617F} , 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.

Считам, че целта и задачите са правилно конструирани и са логично следствие от нерешените досега или противоречиви литературни данни. В достъпната

литература липсват достатъчно проучвания, включващи съвкупността от предвидените за анализ в дисертационния труд фактори.

Материалът и методите са описани подробно, което в случая се изисква поради тяхното разнообразие и в някои аспекти тяхната нестандартност. В дисертационния труд са включени събираните проспективно и ретроспективно данни от 199 пациента с ЕТ и ПВ, разпределени в 2 основни групи, което е добре онагледено в таблица 8. Молекулярно-генетичните и пато-морфологични изследвания за костно-мозъчната ангиогенеза са контролирани чрез групи от здрави лица. Диагностичните критерии и рисковите групи при всички пациенти са определяни според актуалната класификация на СЗО. Използван е богат набор от статистически методи, позволяващ максимално прецизен анализ.

Считам, че тази глава от дисертационния труд е представена подробно, логично и изчерпателно.

Резултатите са представени в следните раздели, съответстващи на посоката на поставените задачи:

1. Влияние на мутационния товар на $JAK2^{V617F}$ за развитието на тромбози
2. Влияние на придружаващата левкоцитоза върху развитието на тромбози
3. Влияние на факторите за вродена тромбофилия за появата на ТС
4. Роля на костно-мозъчната ангиогенеза
5. Оценка на промените в рутинните кръвни показатели

Този дял от дисертационния труд е много добре онагледен с таблици и фигури. Голяма част от резултатите са представени поотделно при двете нозологични единици, което е базирано на спецификите на всяко едно от заболяванията. 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. Не се установява връзка между честотата и/или броя на ТС и величината на левкоцитния брой при пациентите с ЕТ. Факторите за вродена тромбофилия влияят върху честота на ТС и при двете нозологични единици. Това влияние е различно, но е най-силно изразено за $PIA2/GPIIIa$ и $FVLeiden$. В достъпната литература липсват публикации в тази област, с изключение на едно проучване от 1994 г., което прави резултатите от дисертационния труд изключително актуални. 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. При анализ на влиянието, което оказват молекулярните, патолого-анатомични и рутинни показатели при пациентите с ПВ и ЕТ не се установява сигнификантна корелационна зависимост и не е възможно да се обособи независим прогностичен показател за развитието на ТС.

Считам, че резултатите, получени след прецизна статистическа обработка, са теоретично и практически значими, дори в случаите, при които не се установява очакваната сигнификантна разлика или промяна.

Дискусията включва задълбочен анализ на тромботичния процес у здрави лица и пациенти с ЕТ и ПВ, който излиза извън рамките на поставените задачи, но е ценен поради представената възможност за цялостно обрисувана картина на ТС, от които зависи живота на пациентите. Промените в хематокрита при ПВ, които са таргет на съвременното лечение, представляват моментна, статична, локална стойност в периферната вена, в която на практика не се развиват тромботични събития. За оценка на истинското значение на променения хематокрит е удачно той да се съпостави с функционалната оценка на кръвотока в критичните за организма съдове. Авторът стига до логичния извод, че нивото на натрупаните познания досега изисква смяна в подхода за оценка на тромботичните събития при ПВ и ЕТ т.е. не просто да се търсят причините за тромботичното усложнение изобщо, а да се проучат локалните причини за развитие на тромботичните събития, най-вече тези с най-голям морбилитет и морталитет (исхемичен мозъчен инсулт, остър миокарден инфаркт, спланхникусова тромбоза). Възниква идеята за използване на възможностите на новите доплер-ехограски методики при пациентите с ПВ и ЕТ, с цел оценка на кръвотока и промените му в жизненоважните органи, засегнати най-често от ТС. Патологичните фактори и условия са различни при ПВ и ЕТ. Базирайки се на наличието на различия във водещите причини за развитие на артериални (бели) и венозни (червени) тромби, авторът постулира за необходимост от изработване на диференцирани артериални и венозни тромботични модели за всяко от двете заболявания.

Дискусията на дисертационния труд на д-р Антонио Антонов е интересна, показва задълбочените познания на автора, четете се приятно и определено има принос при търсене на логиката на елементите, участващи в тромботичния процес. В случая авторът излиза извън рамките на хематологичната наука, намесвайки патофизиологични, патобиохимични, физически, съдови и пр. фактори, участващи в тромботичния процес, голяма част от които не се вземат под внимание в ежедневието, рутинна медицинска практика.

Изводите са базирани на 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 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. *Приложението е семпло, изчерпателно и може лесно да се въведе в практиката.*

Приложение №2 представлява анкетна карта за търсене на генетични дефекти за тромбофилия при пациенти с МПН. *Считам, че това приложение е практически ценно, особено в случаите на вече явило се ТС, още преди поставяне на диагнозата.*

Приноси на дисертационния труд

Приносите са представени обрано и скромно. Авторът ги е разделил на 3 групи:

1. Приноси 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.

2. Приноси 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.

3. Приноси с приложен характер: Изработен е алгоритъм за изследване на факторите за вродена тромбофилия при пациенти с ПВ и ЕТ. Изработен е алгоритъм „Какво? Как? Кога?“ за определяне на факторите за вродена тромбофилия.

Считам, че въпреки липсата на доказана връзка между някои от изследваните показатели и ТС при пациенти с ЕТ и ПВ, приносите на дисертационния труд са съществени. Установяването чрез задълбочен статистически анализ на липса на свързаност между изглеждащи на пръв поглед свързани събития е резултат, с не по-малка тежест от доказването на силни корелационни връзки.

Библиографията обхваща 134 литературни източника, от които 60 са от последните 10 години и само 8 от преди 2000 г.

Заклучение

В заключение считам, че представеният за становище дисертационен труд на д-р Антонио Иванов Антонов е актуален, основателен, задълбочен, аналитичен и с достатъчно приноси, за да се присъди на дисертанта образователната и научна степен „доктор“.

Варна

14.06.2018

Доц. д-р Лиана Герчева
Д-р Лиана Герчева, д.м., член на научно жури
спец. вътрешни болести
хематология