

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. Анна Петрова Панчева, д.м.
Началник на Катедра по обща и клинична патология, ВМА
за д-р Иван Недков Иванов – докторант
в Катедра по Патологоанатомия, МУ Плевен

ОТНОСНО: Процедура за придобиване на образователна и научна степен „доктор” по научна специалност „Патологична анатомия и цитопатология”, шифър 03.01.03.

Дисертационният труд е на тема „Клинико-морфологични аспекти на тумор-асоциираните лимфатици при рака на гърдата” с научен ръководител: доц. д-р Севелина Любенова Поповска, д.м.

Научният труд е посветен на значим проблем в съвременната медицина - карцином на гърдата. Той е актуален поради това че е водеща причина за смърт от онкологични заболявания при българските жени с тенденция за покачване на смъртността. В дисертационния труд се разработват патоморфологичните механизми за съдово-лимфогенно разпространение на карцинома на гърдата, като съществен механизъм за неговата прогресия и неблагоприятна прогноза.

Дисертационният труд е написан на 212 страници. Структуриран е както следва: Въведение - 2 стр., Литературен обзор - 40 стр., Цел и задачи - 2 стр., Пациенти и методи - 34 стр., Собствени проучвания и резултати - 50 стр., Дискусия и практически препоръки - 33 стр., Изводи и заключение - 3 стр., Практическа значимост на разработката - 2 стр., Книгопис - 34 стр., Списък на публикациите и научните съобщения свързани с дисертационния труд - 1 стр. и Приложения - 7 стр.

Във въведението е подчертана значимостта на лимфогенната съдова дисеминация на карцинома на гърдата, както за стадия на заболяването така и за терапевтичния подход и прогнозата му.

Литературният обзор включва 9 глави с 9 подзаглавия и е онагледен с фигури и таблици. В него авторът проследява в исторически аспект знанията за лимфната система свързана с клиничната практика на карцинома на гърдата и зараждането на идеята за стражевия лимфен възел. Умело и лаконично са представени данните за структурната, ултраструктурната и функционална характеристика на сложната и обширно комуницираща лимфна система и лимфния дренаж на гърдата, във връзка с нейната хистологична организация. Цитирани са съвременните знания за двете основни структурни единици на лимфния дренаж на гърдата: прелимфатични структури, свързани с интрамамарното разпространение на карцинома и лимфните съдове с многобройните си колатерали, отговорни и за

карциномните метастази в контралатералните лимфни възли. Основният акцент в литературния обзор е лимфо-съдовата карциномна инвазия като задължителен етап в лимфогенното дисеминиране и независим предиктивен фактор за аксиларния статус. Представени са литературните данни за молекулните фактори регулиращи физиологичната лимфангиогенеза както и специфичните за туморната лимфангиогенеза маркери. Прегледно в таблица са представени 9-те основни ендотелни и лимфо-ендотелни рецептори и растежни фактори стимулиращи лимфангиогенезата, които намират приложение в съвременната научно-изследователска и клинична практика. Разглеждат се методите за количествена – хистоморфометрична оценка на лимфо-съдовата васкуларизация на солидните карциноми чрез определяне на лимфо-съдовата плътност, измерване на относителните площи, лимфо-ендотелната пролиферация, компютърно-образен анализ, косвени белези и маркери за лимфангиогенеза. В литературния обзор докторанта обсъжда литературните данни за лимфа-дрениращия апарат на гърдата с акцент върху важни неизследвани пунктове, неконкретизирани методи и цитира интересни хипотези за карцинома на гърдата и лимфо-съдовата му инвазия. В заключение на сбития, риторичен и информативен литературен обзор са направени 6 извода, в които критично са обобщени недостатъците на съществуващата информация - непълни и/или липсващи данни, липса на конкретност, както и на противоречиви данни, без единно мнение и липса на алгоритъм за определяне на лимфо-съдовата карциномна инвазия при карцином на гърдата. Изводите мотивират поставянето на целта и задачите.

Целта е правилно и конкретно заявена и за нейното постигане са поставени 5 добре формулирани основни задачи, като първата от тях включва и три подзадачи.

Собствените проучвания са извършени върху инвазивен карцином на гърдата и бенигнени непролиферативни лезии на Отделението по Клинична патология, УМБАЛ „Д-р Г.Странски”, гр. Плевен. Големият брой случаи /187/, позволяващ достоверност на статистическата обработка, прави обширно първото изследване на лимфната система в норма и при карцином на гърдата в нашата страна. Пациентите, прецизно подбрани според строги включващи и изключващи клинични и патоморфологични критерии са групирани в три глави съобразно обединените задачи и подзадачи. Представена е обширна и точна информация, включваща възраст, менструален статус и лечение - оперативно, химио-, лъче-, хормонотерапия и с трансстумаб. В таблица са нагледно представени: хистологичния вариант на карцинома на гърдата, степента на диференциация, класификация по ТНМ по СЗО, хормоналния статус, експресията на HER 2 рецептора и биологичния му тип.

Избрани са правилно 5 основни метода – епидемиологичен, морфологичен, имунохистохимичен, с полуколичествено отчитане, морфометрични и статистически. Те са групирани по всяка от петте задачи.

Стегнато, детайлно и компетентно са описани протоколите за работа на хистохимичните и морфометричните методи. Методите са трудоемки, съвременни и описанието им демонстрира отличната методологична подготовка на д-р Иванов.

Собствените проучвания и резултатите са включени в пет основни глави, съответни на броя и хронологията на поставените задачи. Те са отлично онагледени с фигури и таблици.

Докторантът представя вече установената експресия на маркера Д2-40 в ендотела на лимфните съдове, като демонстрира експресията и в ендотела на непроменената гърда, при нетуморните ѝ заболявания, в ендотела на синусите на лимфните възли и в ендотела на лимфните съдове - интра- и перитуморно на карцинома на гърдата и при лимфо-съдова карциномна инвазия. Описва разликата в типа и интензитета на експресията на маркера в ендотела на лимфните съдове и в дуктални и лобуларни структури на гърдата. Прилагайки коктейл от две антитела Д2-40/p63 съобразно оптимизиран от докторанта протокол за имунохистохимично изследване и достоверна интерпретация на оцветяването разграничава неинфилтративния дуктален и лобуларен карцином от лимфосъдовата карциномна инвазия. Чрез определяне експресията на подоплаин и Е кадхерин прави опит за диференциране на трите типа на карциномна инвазия - чрез единични дискохезивни клетки, колективна миграция и комбиниране на единични клетки с колективната миграция. Д-р Иванов проверява приложимостта на шаблона на Chalkley за оценка на лимфосъдовата васкуларизация при карцинома на гърдата и установява че резултатите от изследването са сигнификантно свързани с реалната лимфо-съдова площ, но отчита неприложимостта му при оценката на лимфангиогенезата. Той разглежда феномена „съд в съд”, наблюдаван от него в 16 случая, предимно в нормалния паренхим на гърдата, за да бъде изключен като потенциален източник на грешки при морфометричния анализ за оценка на съдовата плътност. Представя се и схема за влиянието на налягането в лимфната и/или венозна система върху локализацията на артериолата и при туморен ембол в лимфния съд. Компетентно и отлично онагледена е морфологичната и имунохистохимична характеристика на паренхима на гърдата и лимфните съдове според менструалния статус и във фронта на туморната инвазия на карцинома на гърдата. Морфологичната находка е верифицирана с количествен анализ на прелимфатичната система и лимфните съдове на гърдата. Отчита се изчезване на прелимфатичната система в паренхима на гърдата при инвазивните карциноми и липсата на вътретуморни лимфни съдове, а при наличието им те са локализирани във външната трета на тумора. Сравнителният анализ на интра- и перитуморната лимфо-съдова плътност, съобразен с менструалния статус, установява по-висока плътност при менструиращите жени. Авторът демонстрира експресия на маркера за съдов ендотел СД 34 в ендотела на лимфните капиляри интра- и перитуморно

без туморен растеж и при тези с туморни емболи. С цел изясняване механизмите на тумор асоциираната лимфангиогенеза при рака на гърдата докторанта прилага модифициран протокол за двойно маркиране при имунохистохимичното изследване с Д2-40 и Ki 67. Той не установява сигнификантни разлики в средните стойности на пролиферативния индекс на лимфния ендотел при рака на гърдата, при паренхим на гърдата с некарциномни, непролиферативни лезии, както и при рак на гърдата с позитивен и негативен аксиларен статус. Установява се увеличен брой Т /СД 3 позитивни/ лимфоцити в областта на карциномната инвазия и частично или напълно разрушени дукто-лобуларни единици. Отчита се увеличен брой на ендотелните клетки заграждащи лумена на перитуморните лимфни съдове в сравнение с тези на нормалния паренхим на гърдата без разлика в средните стойности на броя им при пациенти с рак на гърдата с позитивен и негативен аксиларен статус. Установява се и увеличен брой на СД 68 позитивните перитуморни клетки. Те имат непосредствена връзка с тумор променените перитуморни лимфни съдове. Наблюдават се два типа СД 68 позитивни клетки- средно големи и ендотелоподобни като се откриват адхезии на тези клетки с ендотела на перитуморните лимфни капилляри. Тези два типа СД 68 позитивни клетки са позитивни и за лимфо-ендотелния маркер Д2-40, което дава основание на докторанта да предполага възможна трансдиференциация на СД 68 позитивните клетки в лимфо-ендотелни клетки. Процесът на трансдиференциация е отлично онагледен със серия от микроснимки на имунохистохимични реакции на последователни тъканни срези.

Проучена е лимфо-съдовата васкуларизация чрез морфометрично изследване на средната и относителната лимфо-съдова плътност, както и лимфо-съдовата инвазия и връзката ѝ с аксиларния статус. Средната перитуморна лимфо-съдова площ е сигнификантно по-голяма /над два пъти/ от интратуморната. При HER 2 позитивните карциноми на гърдата обаче средната интратуморна васкуларизация е повишена спрямо останалите типове - луменилен А, луминален Б и тройно негативните карциноми. При отделните биологични типове карциноми на гърдата не се установява разлика в лимфогенното метастазиране. При 24 от 111 изследвани случая докторанта установява интра- и перитуморна карциномна съдова инвазия. Чрез сравняване на два метода за откриване на лимфо-съдова инвазия - рутинно хистологично оцветяване с ХЕ и имунохистохимично оцветяване с коктейл от два маркера Д2 40/p63, не намира корелация на методите при интратуморната лимфо-съдова инвазия, но установява такава добра при перитуморната лимфо-съдова инвазия. С голямо практическо значение е установената от д-р Иванов връзка между лимфо-съдовата карциномна инвазия и размера на перитуморната тъкан. Той намира корелация между аксиларният статус и интра- и перитуморната лимфо-съдова инвазия, когато са оценени с имунохистохимичен метод. Този метод за доказване на лимфо-съдовата инвазия - интра- и перитуморна и според д-р Иванов е с висока

специфичност, висока предсказваща стойност, висока точност и чувствителност. Обаче лимфо-съдовата инвазия открита с имунохистохимичен метод не корелира с резултатите от сентинелната биопсия на рака на гърдата. Пациентите с рак на гърдата и стандартно лечение, проследени до 60 месеца показват статистическо значимо повлияване на 5 годишната преживяемост от аксиларния статус но не и от лимфо-съдовата карциномна инвазия.

От изложените резултати личи възможностите на дисертанта за обективни наблюдения и точни описания.

Дискусията е представена хронологично на поставените задачи. Тя е задълбочена и пространна и представлява критичен паралелен анализ на данните от литературата и резултатите от собствените проучвания. В нея личи отличната теоретична и практическа подготовка на д-р Иванов, както и уменията му да открива закономерности. Авторът потвърждава данните за Д2 40 /анти-подопланиновото антитяло/ като най-добър маркер за ендотела на лимфните съдове, но за първи път разглежда експресията му в нормални структури на гърдата и при карцином на гърдата. Той за първи път създава адаптиран протокол за имунохистохимично изследване с две антитела /Д2-40/р63/ за идентифициране на лимфо-съдовата инвазия и разграничаването ѝ от неинвазивния дуктален и лобуларен карцином.

Д-р Иванов изработва модифициран шаблон на Chalkley, адаптиран за микроскоп Olympus BX 40 за морфометрия на относителната лимфо-съдова площ и потвърждава приложимостта му, но отбелязва че той трудно може да се използва за оценка на лимфангиогенезата при карцинома на гърдата. Той обаче препоръчва метода който прилага, а именно компютърен образен анализ при изчисляване на относителната съдова площ при рака на гърдата, като подчертава техническото му превъзходство. Освен че наблюдава вече познатия феномен „съд в съд”, докторанта за първи път наблюдава и описва лимфо-съдова артериална разновидност на този феномен и неговия смисъл за дигиталния морфометричен анализ на лимфната система. За първи път е описана количествено прелимфатичната система неангажирана от карцинома на гърдата, съобразена с менструалния статус. Авторът потвърждава липсата на лимфо-ендотелна пролиферация при рака на гърдата и демонстрира възможността за трансдиференциация на моноцитите в лимфо-ендотелни клетки, като свързва дилатацията на емболизираните от карцинома лимфни съдове и с трансдиференциацията. Авторът потвърждава ролята на лимфо-съдовата карциномна инвазия за прогнозиране на аксиларния статус, като за повишаване на предиктивната ѝ роля препоръчва перитуморната тъкан да е по-голяма от 3 мм. Препоръчва се при инвазивни карциноми с размер до 20 мм липсата на лимфо-съдова инвазия да се диагностицира с двата метода-оцветяване с ХЕ и имунохистохимично оцветяване. Разработен е алгоритъм за прогнозиране на аксиларния статус чрез лимфо-съдовата инвазия с точност до 70%.

Съобразно извършените изследвания и получените резултати са направени 9 извода, които са конкретни и дават отговор на поставените задачи.

Дисертационният труд е постигнал първоначално заявената цел.

Докторантът е с богата литературна осведоменост по темата. Литературната справка включва 254 автора от които 12 на кирилица, а останалите на латиница. Литературната справка е осъвременена, като 32% от публикациите са от последните 6 години.

Трудът е добре оформен технически, написан е на правилен български език с добър научен стил. Документацията е прецизна и с високо качество, включваща 85 фигури и 28 таблици.

Представеният труд има значителна теоретична и приложно-практическа значимост, заради която приемам отчетените 15 приноса, които са с прилежен, научно-теоретичен и потвърдителен характер.

В дисертационния труд са включени 7 приложения за адаптирани, оптимизирани и подбрани протоколи за имунохистохимично изследване, морфометрични методи и алгоритъм за лимфо-съдовата инвазия при пациенти с рак на гърдата.

Дисертантът има 3 научни публикации по дисертацията, в две от които е първи автор, а в едната е самостоятелен автор. Направени са и 3 научни съобщения, в които също е първи автор.

Авторефератът е правилно конструиран, с обем от 84 страници и включва основните раздели на дисертацията.

Дисертацията е лично дело на д-р Иванов.

В резултат на изложеното и предвид актуалността на проблема, извършените прецизни изследвания върху голям по обем материал, с богата съвременна методика, отличната критична интерпретация на собствените проучвания, които са солидна предпоставка за значимите резултати с приносен характер, с убеденост и горещо препоръчвам на уважаемите членове на научното жури да гласуват за присъждане на образователната и научна степен „доктор” на д-р Иван Недков Иванов.

15.09.2012 г.


Доц. А.Панчева